

桑叶酚类物质的变化规律研究

沈维治^{1,2}, 廖森泰^{1,2*}, 邹宇晓¹, 肖更生¹, 刘吉平², 杨春英¹

(1. 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所 广东省农产品加工公共实验室, 广东 广州 510610;

2. 华南农业大学动物科学学院, 广东 广州 510642)

摘要:目的 测定不同品种桑叶在不同采收时间总多酚及绿原酸、芦丁、安息香酸和黄芪苷4种主要酚类单体化合物的量,初步探讨桑叶酚类物质的变化规律。方法 采用Folin Phenol法测定桑叶中总多酚的量,采用HPLC法测定绿原酸、芦丁、安息香酸和黄芪苷的量。结果 6个品种桑叶总多酚量在4~10月连续7个月内变化的趋势基本相同。各品种中13种酚类单体物质的变化比较复杂:同一品种桑叶中不同酚类物质变化不一样,不同品种桑叶中相同酚类物质变化也不一样。结论 不同品种桑叶的酚类单体成分的组成及其变化规律具有品种特异性,在相同栽培条件及气候条件下,桑叶中酚类物质的量在不同品种之间有差异,但在所有品种中多酚的量均以绿原酸最高,其次为芦丁,再次为安息香酸和黄芪苷。

关键词:桑叶;多酚;变化规律

中图分类号:R282.7

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2010)11-1890-03

桑叶性味甘、苦、寒,归肺、肝经,用于风热感冒、肺热燥咳、头晕头痛、目赤昏花。桑叶已被《中国药典》收录。《神农本草经》称桑叶为“神仙叶”,具有疏散风热、益肝通气、降压利尿等功效;《本草纲目》记载:桑叶“汁煎代茗,能止消渴”,“灸熟煎饮,代茶止渴”^[1];历代中医药典籍中有许多关于桑叶治疗消渴症的记载,现代药理学研究表明桑叶除具有传统的药用价值外,还具有抗氧化、抗衰老、调血脂、降血糖^[2]、抗应激、增强机体耐力、降低血清胆固醇、调节肾上腺功能及抗癌等作用,桑叶对微生物也有抑制作用,已经被国家卫生部正式列入“既是食品又是药品”的名单。

植物多酚为植物体内的复杂酚类次生代谢物,具有多元酚结构,主要存在于植物的皮、根、叶、果中,在植物中的量仅次于纤维素、半纤维素和木质素^[3]。桑叶中富含的多酚类物质因其化学结构具有活泼的羟基氧,能在多酚氧化酶作用下终止生物体内自由基的链锁反应,起到清除自由基和消除自由基毒性的作用^[4],从而表现出抗衰老、抗辐射、防治肿瘤及增加机体免疫力等多种生物活性^[5]。研究表明,桑叶多酚主要由绿原酸、芸香苷等单体成分所组成^[6]。本研究采用高效液相色谱法对不同采摘时间和不同品种桑叶中的酚类物质的变化规律进行研究,以期对桑叶多酚类成分进行比较全面的考察,为桑叶药材的鉴别以及质量评价提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂、仪器

1.1.1 材料:供试桑叶为育2、紫白4、大10、湘7920、抗青10号、粤桑11号6个品种,采于广东省农业科学院大丰基地桑园。60℃烘干至恒定质量,粉碎,过60目筛,储藏备用。

1.1.2 对照品:没食子酸、龙胆酸、绿原酸、儿茶素、香草酸、咖啡酸、丁香酸、表儿茶素、芦丁、金丝桃苷、安息香酸、黄芪苷、槲皮素。其中安息香酸、丁香酸、香草酸、咖啡酸、龙胆酸由美国Sigma公司生产,其余均为国产。

1.1.3 试剂:乙醇(分析纯),没食子酸(分析纯),冰醋酸(分析纯),乙腈(色谱纯)。

1.1.4 仪器:Agilent Technologies 1200 Series 高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司),UV-1700紫外分光光度计(日本岛津),PHS-3C精密pH计(上海雷磁仪器厂),KS-300E II型超声波清洗机(宁波海曙科生超声设备有限公司),EYELA N-1001 旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司)。

1.2 桑叶样品采集:6个品种从4月份到10月份每个月采集一次。

1.3 酚类物质的提取:酚类物质提取采用超声波提取法,将各品种的干燥桑叶粉碎,过60目筛,准确称取1.0g,用40mL70%乙醇(pH 4)于超声波清洗机中提取30min,提取液减压浓缩,用纯净水定容

①收稿日期:2010-03-30

基金项目:广东省自然科学基金团队项目(粤科基字[2009]2号;现代农业产业技术体系建设专项资金(财教[2008]370号);广东省科技厅社会发展攻关项目(编号2008A030101001)

作者简介:沈维治(1982-),男,湖南省岳阳市人,硕士研究生。E-mail:skyforce12@163.com

* 通讯作者 廖森泰 T el:(020)87596248 E-mail:liaost@163.com

至 25 mL, 摇匀, 4 °C 保存备测。

1.4 总酚的测定: 桑叶总酚的测定采用 Folin Ciocalteu 法^[7]。取 0.2 mL 提取液定容至 10 mL, 取 1 mL 稀释样品, 加入 1 mL 福林酚试剂和 2 mL 10% 碳酸钠溶液, 混匀, 置于 25 °C 水浴 60 min 后, 在 765 nm 下测定吸光度, 测定 3 次取其平均值。

1.5 色谱条件: ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相 A: 乙腈, B: 0.4% 冰醋酸; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 °C; 检测波长 280 nm; 梯度洗脱程序: 流动相 B 在 0~40 min 时, 95% → 75%; 在 40~45 min 时, 75% → 65%; 在 45~50 min 时, 65% → 50%; 在 50~55 min 时, 50% → 45%。根据样品的出峰保留时间比对照品的保留时间, 确定样品中单体酚类物质的组成; 外标法测定每个品种单体酚类物质的量。

1.6 对照品溶液配制: 准确称取对照品各 0.010 0 g, 用纯甲醇定容至 10 mL, 4 °C 保存备测。

2 结果与分析

2.1 不同桑叶品种在不同采集时间总多酚量变化

2.1.1 没食子酸标准曲线和方程: 以溶液质量浓度 (μg/mL) 为横坐标, 吸光度 (A) 为纵坐标, 制作标准曲线并得出回归方程与回归系数。回归方程为: $Y = 0.0404X + 0.0032$, $r = 0.9991$, 线性范围为 4~16 μg/mL。

2.1.2 品种和采集时间对桑叶总多酚的量变化的影响: 季节变化会引起温度、光照等生态因子的改变, 桑叶成熟度和体内物质积累也受季节影响。选取 6 个品种分别在 7 个月份采收, 进行桑叶总多酚的测定, 由图 1 结果可知, 各个品种间总多酚量在 4 月份最低, 到 5 月份时达到最大值。5 月过后逐渐下降, 7 到 8 月份开始又缓慢上升直至 10 月份, 量有较大的增多。

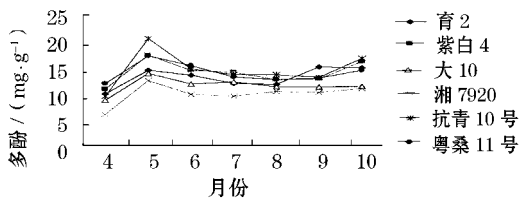


图 1 不同品种桑叶在不同采集时间的总酚量的变化

Fig 1 Change of total polyphenol in mulberry leaves of different varieties in different collection times

2.2 采集时间对桑叶中主要单体酚类物质质量变化的影响

2.2.1 液相色谱标准曲线的制备: 在确定的色谱条件下测定不同质量浓度的对照品混合液, 以各梯度

质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得到酚类单体化合物的回归方程(表 1)。各对照品质量浓度与峰面积的相关性良好, $r > 0.9992$ 。

表 1 13 种酚单体的标准曲线

Table 1 Standard curves of 13 kinds of polyphenol monomer

| 化合物 | 线性回归方程 | r | 线性范围/ng | t _R /min |
|------|-------------------------|--------|-------------|---------------------|
| 没食子酸 | $Y = 2234.93X + 15.49$ | 0.9992 | 2.02~20200 | 5.483 |
| 龙胆酸 | $Y = 606.23X + 4.11$ | 0.9996 | 8.627~11000 | 13.372 |
| 绿原酸 | $Y = 2017.63X - 30.163$ | 0.9994 | 7.02~20800 | 15.738 |
| 儿茶素 | $Y = 689.09X + 28.66$ | 0.9995 | 11.48~20200 | 16.038 |
| 香草酸 | $Y = 1592.73X + 5.07$ | 0.9999 | 0.545~10700 | 18.669 |
| 咖啡酸 | $Y = 3724.23X + 6.61$ | 0.9999 | 0.427~10900 | 19.077 |
| 丁香酸 | $Y = 3082.04X + 0.14$ | 0.9997 | 2.76~21600 | 19.954 |
| 表儿茶素 | $Y = 706.07X - 0.61$ | 0.9998 | 9.66~20200 | 21.090 |
| 芦丁 | $Y = 740.46X - 2.14$ | 0.9994 | 9.19~20600 | 29.929 |
| 金丝桃苷 | $Y = 961.88X + 1.48$ | 1.0000 | 1.03~20200 | 30.846 |
| 安息香酸 | $Y = 1862.21X + 13.30$ | 0.9999 | 29.96~10700 | 33.949 |
| 黄芪苷 | $Y = 1188.83X + 5.97$ | 0.9999 | 4.27~20200 | 35.629 |
| 槲皮素 | $Y = 1438.25X - 1.45$ | 0.9997 | 5.75~20200 | 47.608 |

2.2.2 6 个桑叶品种在 4~10 月 7 个月份中主要单体酚类物质的量变化: 用本实验确定的 HPLC 测定方法对 6 个桑树品种桑叶在 4~10 月 7 个月份中 4 种主要单体酚类物质的量进行了测定, 由表 2 结果可知, 在不同月份, 4 种主要单体酚类物质在 6 个桑树品种桑叶中的量变化比较复杂。绿原酸的量以紫白 4 最高, 育 2 较低; 多数品种中绿原酸在不同月份中变化规律相似, 4 月份时的量均不高, 在 5 月份时的量达到最高。芦丁的量以抗青 10 号最高, 育 2 最低; 4~10 月, 抗青 10 号、粤桑 11 号、紫白 4 中芦丁的量均先减少后增多。安息香酸的量以粤桑 11 号最高, 大 10 较低; 粤桑 11 号、育 2、紫白 4、湘 7920 变化趋势大体相同, 从 4 月份开始增加, 5、6 月份减少, 到 8、9 月份又开始增加。黄芪苷的量相差不大, 以育 2 和粤桑 11 号较高, 大 10 较低; 从 4 月份到 8 月份各品种中黄芪苷的变化趋势基本一样。

2.3 品种育 2 在不同采集时间酚类物质液相色谱图: 育 2 在各个月份酚类物质图谱相似, 共有峰较多, 说明同一品种桑叶内在质量差别不大, 多酚类成分组成基本一样。峰的多少与峰面积表明不同月份酚类物质组成和量存在一定的差异。见图 2。

3 讨论

3.1 总多酚变化规律: 6 个桑叶品种总多酚在 4~10 月 7 个月份中的量不同, 但变化的趋势基本相同, 各个品种间总多酚在 4 月份量最低, 到 5 月份时达到最大值。5 月过后逐渐下降, 从 7 到 8 月份开始又缓慢上升直至 10 月份, 有较大的增多。

3.2 不同品种的酚类单体成分的组成及其变化规

表 2 不同月份各品种桑叶中主要单体酚类物质的量

Table 2 Contents of main phenol compounds in mulberry leaves in different months

| 化合物 | 桑叶品种 | 质量分数/% | | | | | | | |
|------|---------|--------|------|------|------|------|------|------|--|
| | | 4月 | 5月 | 6月 | 7月 | 8月 | 9月 | 10月 | |
| 绿原酸 | 育 2 | 1.72 | 1.79 | 1.79 | 1.51 | 1.12 | 2.03 | 1.00 | |
| | 紫白 4 | 1.95 | 3.08 | 2.34 | 2.00 | 2.31 | 2.23 | 2.41 | |
| | 大 10 | 0.97 | 1.27 | 2.52 | 1.33 | 1.99 | 1.05 | 1.28 | |
| | 湘 7920 | 1.65 | 2.15 | 2.12 | 2.08 | 2.14 | 2.33 | 1.68 | |
| | 抗青 10 号 | 2.65 | 2.84 | 2.62 | 1.75 | 1.21 | 1.91 | 2.21 | |
| | 粤桑 11 号 | 2.43 | 2.61 | 1.65 | 1.44 | 1.33 | 2.22 | 2.93 | |
| 芦丁 | 育 2 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.26 | 0.44 | |
| | 紫白 4 | 0.44 | 0.33 | 0.56 | 0.13 | 0.25 | 0.37 | 0.50 | |
| | 大 10 | 0.00 | 0.33 | 0.61 | 0.34 | 1.05 | 0.32 | 0.45 | |
| | 湘 7920 | 0.00 | 0.14 | 0.08 | 0.43 | 0.22 | 0.27 | 0.12 | |
| | 抗青 10 号 | 0.96 | 1.03 | 0.76 | 0.86 | 1.45 | 1.51 | 1.85 | |
| | 粤桑 11 号 | 0.69 | 0.84 | 0.75 | 0.30 | 0.45 | 0.83 | 0.76 | |
| 安息香酸 | 育 2 | 0.62 | 0.79 | 0.46 | 0.39 | 0.54 | 0.56 | 0.39 | |
| | 紫白 4 | 0.30 | 0.69 | 0.85 | 0.38 | 0.49 | 0.41 | 0.28 | |
| | 大 10 | 0.00 | 0.09 | 0.24 | 0.24 | 0.22 | 0.04 | 0.09 | |
| | 湘 7920 | 0.24 | 0.72 | 0.56 | 0.61 | 0.54 | 0.44 | 0.19 | |
| | 抗青 10 号 | 0.18 | 0.04 | 0.03 | 0.21 | 0.33 | 0.47 | 0.55 | |
| | 粤桑 11 号 | 0.93 | 1.00 | 0.81 | 0.54 | 0.61 | 0.94 | 0.97 | |
| 黄芪苷 | 育 2 | 0.37 | 0.51 | 0.29 | 0.41 | 0.56 | 0.84 | 0.51 | |
| | 紫白 4 | 0.16 | 0.40 | 0.46 | 0.50 | 0.55 | 0.67 | 0.88 | |
| | 大 10 | 0.00 | 0.26 | 0.22 | 0.30 | 0.57 | 0.19 | 0.29 | |
| | 湘 7920 | 0.12 | 0.35 | 0.25 | 0.52 | 0.44 | 0.41 | 0.17 | |
| | 抗青 10 号 | 0.17 | 0.28 | 0.15 | 0.45 | 0.47 | 0.36 | 0.51 | |
| | 粤桑 11 号 | 0.43 | 0.53 | 0.49 | 0.40 | 0.66 | 0.74 | 0.88 | |

律:不同品种桑叶的酚类单体成分的组成及其变化规律具有品种特异性。6 个品种桑叶中 13 种酚类物质在 4~10 月 7 个月份中的变化比较复杂,同一品种桑叶中不同的酚类物质变化不一样,不同品种桑叶中相同的酚类物质变化也不一样。表明在相同栽培条件

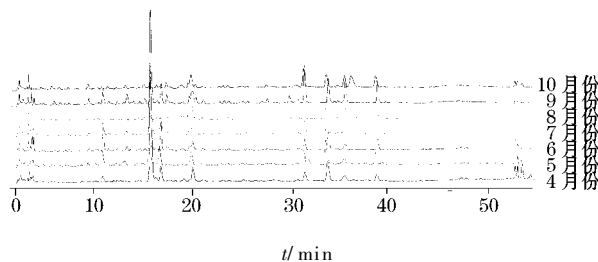


图 2 育 2 品种在不同月份酚类物质色谱图

Fig 2 Chromatogram of variety Yu 2 of phenol compounds in different months

及气候条件下,桑叶中酚类物质的量在不同品种之间有差异。但在所有品种中多酚的量均以绿原酸最高,其次为芦丁,再次为安息香酸和黄芪苷。

本实验所测定的 13 种酚类物质中,有两种成分的加样回收率大于 100%,可能是方法的本身误差、处理样品时的误差或样品中的杂质引起的正误差。有 7 种成分的加样回收率低于 95%,可能是多酚物质在常温下容易发生化学变化造成的。

参考文献:

[1] 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
 [2] 孙莲,孟强,阎超等.桑叶的降血糖活性成分和药理作用[J].中草药,2002,33(5):471-473
 [3] 孙达旺.植物单宁化学[M].北京:中国林业出版社,1992
 [4] 杨贤强,曹明富,沈生荣等.茶多酚生物学活性的研究[J].茶叶科学,1993,13(1):51-59
 [5] 安徽农学院.茶叶生物化学[M].北京:农业出版社,1980
 [6] 张鞍灵,马琼,高锦明等.绿原酸及其类似物与生物活性[J].中草药,2001,32(2):173
 [7] Julkuner Tiitto R. Phenolics constituents in leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics [J]. J Agric Food Chem, 1985, 33: 213-217.

温度及种根大小对附子萌发及苗期性状的影响

罗意¹,陈兴福^{1*},杨文钰¹,舒光明²,刘莎¹,夏燕莉²

(1 四川农业大学,四川雅安 625014; 2 四川省中医药科学院,四川成都 610041)

摘要:目的 阐明不同温度及种根大小对附子萌发及苗期性状的影响。方法 用光照培养箱控制附子的发芽温度,观察不同温度下不同大小附子种根的发芽情况。结果 变温处理较恒温处理的附子种根发芽时间短,发芽率、发芽势和发芽指数均较高,小种根的发芽率、发芽势、发芽指数均高于大、中种根,苗期性状表现也较好。结论 种根在 10 g 左右发芽的综合性能优良,早春应加强水分管理提高种根发芽率。

关键词:附子; 温度; 种根; 发芽

中图分类号:R282.2

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2010)11-1892-04

①收稿日期:2010-01-03

基金项目:科技部“十一五”支撑计划项目(2006BAI06A12-01);四川省育种攻关项目(2006yzzg12-21)

作者简介:罗意(1986-),女,重庆人,在读硕士研究生,从事药用植物生理、栽培等研究。

Tel: (0835)2882612 E-mail: kbllily@163.com

* 通讯作者 陈兴福 Tel: (0835)2882612 E-mail: chenxf64@sohu.com