

# 不同产地野生桑黄中总黄酮含量比较

胡碧辉

宁波市奉化区中医医院, 浙江 宁波 315500

**[摘要]** 目的: 比较全国不同产地野生桑黄中总黄酮的含量。方法: 采用 70% 乙醇回流提取各产地的野生桑黄总黄酮, 利用 AB-8 型大孔吸附树脂对总黄酮进行纯化, 所得总黄酮供试品经紫外分光光度法测定总黄酮含量, 以芦丁为对照品, 波长为 507 nm。结果: 吉林长白山、山东夏津、西藏昌都、云南临沧、安徽金寨、四川甘孜 6 个产地的野生桑黄中总黄酮含量分别为 62.22、55.84、60.08、37.64、48.63 和 39.90 mg/g。结论: 所建立的方法能准确快速地对样品中的总黄酮进行测定; 产地不同, 野生桑黄的总黄酮含量存在差异。

**[关键词]** 野生桑黄; 总黄酮; 含量比较; 不同产地; 大孔吸附树脂; 紫外分光光度法

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2018) 12-0028-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2018.12.008

## Comparison of the Content of Total Flavonoids in Wild Phellinus Igniarius from Different Producing Areas

HU Bihui

**Abstract:** Objective: To compare the content of total flavonoids in wild phellinus igniarius from different producing areas. **Methods:** Used 70% ethanol to reflux and extract total flavonoids from wild phellinus igniarius from different places, and purified total flavonoids by using AB-8 macroporous resin, and determined the content of total flavonoids by UV spectrophotometry. Rutin was used as the reference substance with a wave length of 507 nm. **Results:** The content of total flavonoids in wild phellinus igniarius from Changbai Mountain of Jilin Province, Xiajin of Shandong Province, Changdu of Tibet, Lincang of Yunnan Province, Jinzhai of Anhui Province and Ganzi of Sichuan Province was 62.22, 55.84, 60.08, 37.64, 48.63 and 39.90 mg/g, respectively. **Conclusion:** The established method can determine the total flavonoids in samples accurately and quickly. The content of total flavonoids in wild phellinus igniarius was different in different producing areas.

**Keywords:** Wild phellinus igniarius; Total flavonoids; Comparison of content; Different producing areas; Macroporous resin; UV spectrophotometry

桑黄又名桑臣、桑耳、胡孙眼、桑黄菇等, 始载于《神农本草经》, 早在两千多年前就已经作为名贵中药材使用<sup>[1]</sup>。桑黄可利五脏、软坚、止血、活血、和胃止泻, 主治淋病、崩漏带下、癥瘕积聚、癖饮、脾虚泄泻。现代医学研究证实, 桑黄在抗肿瘤、提高机体免疫力、保护肝脏等方面均具有确切的疗效<sup>[2-4]</sup>, 起效的物质基础多指向黄酮和多糖两类物质, 而总黄酮的含量影响着桑黄的质量<sup>[5]</sup>。野生桑黄素有“森林黄金”之称, 随着桑黄被越来越多的人追捧, 野生桑黄的数量正在急剧减少。桑黄在我国东北、华北、西北、华东等地均有分布, 地域环境不同, 桑黄的质量也存在差异, 本研究以总黄酮含量

为观察指标, 比较全国 6 个主要产地野生桑黄的质量, 以期能为野生桑黄的保护和合理开发提供依据。

### 1 仪器、试剂与药品

1.1 仪器 UV-1800 紫外分光光度计(岛津公司); HH.S11-4 型电热恒温水浴锅(上海博讯医疗生物仪器股份有限公司); XS205 十万分之一电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司); ME4002T 百分之一电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司); KQ-250GTD 型超声波清洗器(上海精密仪器仪表有限公司); KDM 型电热套(山东鄄城华鲁电热仪器有限公司); XL-04B 摇摆式粉碎机(广州市旭朗机械设备有限公司); RE-52AA 型旋转

**[收稿日期]** 2018-08-13

**[作者简介]** 胡碧辉 (1975-), 男, 副主任中医师, 研究方向: 中药鉴定与成分分析。

蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); SHB-B95型真空泵(郑州长城科工贸有限公司); BT300-2J恒流泵(保定兰格恒流泵有限公司)。

1.2 试剂与药品 芦丁对照品(中国食品药品检定研究院, 供含量测定用, 含量92.6%, 批号: 100080-201610); 乙醇、亚硝酸钠、硝酸铝、氢氧化钠等试剂均为分析纯(国药集团化学试剂有限公司); 水为超纯水(自制); AB-8型大孔吸附树脂(沧州宝恩化工有限公司); 野生桑黄为2017年10—11月分别采自吉林长白山、山东夏津、西藏昌都、云南临沧、安徽金寨、四川甘孜6地, 经浙江中医药大学张水利教授鉴定为多孔菌科真菌火木层孔菌 *Phellinus igniarius*(L.ex Fr.) Quel.的子实体。

## 2 研究方法与结果

2.1 总黄酮的提取及纯化<sup>[6-7]</sup> 取桑黄200g, 置摇摆式粉碎机中粉碎成中粉, 混合均匀, 取20g, 精密称定, 置于圆底烧瓶中, 加入70%乙醇500mL, 浸泡30min, 回流提取60min, 滤过, 收集滤液, 用70%乙醇100mL洗涤滤渣, 合并滤液, 置于旋转蒸发器中回收乙醇至无醇味, 备用。取100g经预处理的AB-8型大孔吸附树脂, 湿法装柱(2.7cm×16cm)。将上述备用样品上柱, 静置1h, 先用3BV的纯化水洗脱, 再用5BV70%乙醇以2BV/h的流速洗脱, 收集乙醇洗脱液, 加70%乙醇定容至500mL, 摇匀, 即得纯化后的桑黄总黄酮。

2.2 对照品溶液制备 取芦丁对照品约20mg, 精密称定, 置于100mL量瓶中, 加70%乙醇溶解并稀释至100mL, 摇匀, 即得浓度为0.2104mg/mL的对照品溶液。

2.3 供试品溶液制备 分别取不同产地的桑黄, 按照2.1项下方法制备桑黄总黄酮液, 然后精密量取10mL, 置于100mL量瓶中, 用70%乙醇稀释至100mL, 摇匀, 即得。

2.4 线性范围考察<sup>[8]</sup> 精密吸取对照品溶液0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0mL, 分别置于25mL量瓶中, 各加70%乙醇至6.0mL, 加5%亚硝酸钠溶液1.0mL, 摇匀, 放置6min, 加10%硝酸铝溶液1.0mL, 摇匀, 放置6min, 加氢氧化钠试液10mL, 加乙醇至100mL, 摇匀, 放置15min, 以第1管作为空白, 在507nm处测定吸光度, 结果见表1。以芦丁量(mg)为横坐标, 以吸光度(A)为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程为 $Y=0.635X-0.048$ ,  $r=0.9989$ 。结果表明, 芦丁在0.2104~1.0520mg范围内线性关系良好。

表1 芦丁标准曲线绘制

芦丁量(mg)	0.2104	0.4208	0.6312	0.8416	1.0520
吸光度(A)	0.081	0.215	0.363	0.497	0.608

2.5 精密度试验 精密吸取芦丁对照品溶液3.0mL, 按照2.4项下方法操作, 重复测定6次,  $RSD=0.15\%$ , 结果见表2。结果表明, 仪器精密度良好。

表2 精密度试验

编号	1	2	3	4	5	6	$\bar{x}$	RSD(%)
吸光度(A)	0.364	0.364	0.363	0.364	0.363	0.363	0.3635	0.15

2.6 稳定性试验 精密吸取供试品溶液3.0mL, 按照2.4项下方法操作, 每隔10min测定1次吸光度, 连续测定6次,  $RSD=0.18\%$ , 见表3。结果表明, 供试品溶液显色后在50min内稳定性良好。

表3 稳定性试验

时间(min)	0	10	20	30	40	50	$\bar{x}$	RSD(%)
吸光度(A)	0.410	0.411	0.410	0.409	0.410	0.411	0.4102	0.18

2.7 重复性试验 精密吸取供试品溶液3.0mL, 共6份, 分别按照2.4项下方法操作, 测定吸光度, 结果见表4。结果表明, 本含量测定方法重复性良好。

表4 重复性试验

编号	1	2	3	4	5	6	$\bar{x}$	RSD(%)
吸光度(A)	0.408	0.410	0.412	0.409	0.409	0.411	0.4098	0.36

2.8 加样回收率试验 精密吸取供试品溶液(黄酮含量: 0.2403mg/mL)1.5mL, 共6份, 分别置于25mL量瓶中, 精密加入芦丁对照品溶液(0.2104mg/mL)1.7mL, 其余按照2.4项下方法操作, 测定吸光度, 计算加样回收率, 结果见表5。结果表明, 本含量测定方法回收率良好。

表5 加样回收率试验

取样量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
0.36045	0.35768	0.7093	99.74		
0.36045	0.35768	0.7146	99.01		
0.36045	0.35768	0.7103	97.81	98.39	0.70
0.36045	0.35768	0.7129	98.54		
0.36045	0.35768	0.7157	99.32		
0.36045	0.35768	0.7115	98.15		

2.9 不同产地桑黄总黄酮含量测定 取不同产地的桑黄, 按2.1项下方法制备黄酮提取液, 按照2.4项下方法操作, 测定吸光度, 计算总黄酮含量, 结果见表6。结果表明, 不同产地的桑黄总黄酮含量不同, 含量为37.6~62.2mg/g不等。从收集到的样品来看, 吉林长白山、西藏昌都所生的桑黄总黄酮含量较高, 云南临沧、四川甘孜所生的桑黄总黄酮含量略低。

表6 不同产地桑黄总黄酮含量测定(n=3)

编号	产地	总黄酮含量(mg/g)	平均含量(mg/g)
1	吉林长白山	62.22	
2	山东夏津	55.84	
3	西藏昌都	60.08	50.72
4	云南临沧	37.64	
5	安徽金寨	48.63	
6	四川甘孜	39.90	

### 3 讨论

桑黄子实体坚硬,在粉碎前需要先用斧头砍成小块,才能有利于摇摆式粉碎机粉碎。试验过程中,笔者对比了热回流提取和超声提取,结果显示,热回流提取能充分地黄酮进行提取,而超声提取率仅为73%,分析原因为桑黄子实体的组织和细胞坚实而又具有一定的韧性,超声引起的溶剂分子空爆不足以破坏组织和细胞,导致内部的黄酮提取率较低,而回流提取热溶剂的穿透性和溶解性大大提升<sup>[9]</sup>,确保提取充分。

紫外分光光度法较高效液相色谱法有优势,可以利用一种对照物质来测定一大类物质的含量,而且测试成本更低;但紫外分光光度法较高效液相色谱法也有劣势,即显色机理的专属性差,供试品中的其他成分容易干扰显色反应,从而影响测试结果的准确度,因此,为提高检测的准确性,应采用理化手段提高待测组分的纯度<sup>[10]</sup>。而黄酮纯化最常用到的AB-8型大孔吸附树脂,可将黄酮提取液的纯度由20%提升到60%,大大提高了检测的准确性。

近些年掀起的桑黄热导致野生桑黄的价格一路飞涨,部分地区寻采野生桑黄者趋之若鹜,使得本就数量不多的野生桑黄越来越少。随着现代微生物培养技术的进步,已经可以实现桑黄子实体的人工培育,但是限于技术的成熟度而未能推广<sup>[11]</sup>。农林等相关部门应助力桑黄人工培育的发展,从根本上解决桑黄药源问题。除此之外,还应当出台相应的政策加强对野生桑黄的保护,禁止滥采,这将有助于野生桑黄的自然繁育和规模的扩大。

不同产地的野生桑黄总黄酮含量有差异,这与不同产地的温度、光照、水分、土壤等因素有密不可分的关系<sup>[12]</sup>。黄酮含量的高低,仅可作为桑黄质量评价的标准之一,若要全面地评价桑黄质量,还应当对多糖、三萜、微量元素等展开系统的研究。

### [参考文献]

- [1] 史帧婷,包海鹰. 桑黄类真菌有效成分及功效研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(22): 197-202.
- [2] 王稳航,李玉,李兰会. 药用真菌桑黄抗癌功能的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2006, 6(10): 115-118.
- [3] 张万国,胡晋红. 桑黄预防大鼠肝纤维化作用的实验研究[J]. 药学服务与研究, 2002, 2(2): 82-84.
- [4] Hwang JS, Kwon HK, Kim JE, et al. Immunomodulatory effect of water soluble extract separated from mycelium of *Phellinus linteus* on experimental atopic dermatitis [J]. BMC Complement Altern Med, 2012, 12(1): 159.
- [5] 齐欣,张俊,陈颖,等. 六种不同树种桑黄有效成分的比较[J]. 食品科学, 2010, 31(6): 199-201.
- [6] 包海鹰,孙德立. 桑黄黄酮提取工艺的研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(3): 516-518.
- [7] 孙锦秀. 大孔吸附树脂纯化桑黄总黄酮工艺[J]. 实用药物与临床, 2012, 15(11): 744-746.
- [8] 李清林,陶锋. 浙江省不同产地金钱草总黄酮含量的测定[J]. 中国中医药科技, 2017, 24(1): 49-50.
- [9] 王欢,郭婕,周云雷. 竹柏叶总黄酮不同提取方法比较[J]. 天然产物研究与开发, 2016(28): 409-415, 419.
- [10] 赵鑫,李铁军,于治国,等. 贯叶金丝桃药材中萘啶二萜酮类成分的分光光度法和HPLC法定量分析[J]. 药学服务与研究, 2011, 11(6): 434-438.
- [11] 刘红锦,蒋宁,张苏珍,等. 桑黄人工培育研究进展[J]. 江西农业学报, 2011, 23(9): 166-170.
- [12] 徐海军,徐海燕. 浅谈地球化学环境与药材有效成分的关系[J]. 内蒙古中医药, 2007, 26(4): 62-65.

(责任编辑:吴凌)