

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.05.018

广西产桑叶调节血脂作用及成分鉴定研究*

曾瑜¹,李远杰¹,马健雄²,陈路^{3△}

(1. 广西医科大学第四附属医院·柳州市工人医院,广西柳州 545005; 2. 广西金海堂药业有限责任公司,广西 南宁 530313; 3. 广西药用植物园,广西 南宁 530023)

摘要:目的 研究广西产桑叶调节血脂作用并对调脂活性成分进行鉴定。方法 采用 Triton WR-1339 诱导建立急性高脂血症小鼠模型,给药后分别测定小鼠血清总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)及低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)的含量,观察桑叶水提取物、桑叶醇提取物、桑叶水提取物+桑叶醇提取物的调节血脂效果,用高效液相色谱-四级杆串联飞行时间质谱(HPLC-Q-TOF/MS)法对调脂效果最好的一组入血成分进行鉴定。结果 各组桑叶提取物均有一定的调节血脂作用,且具有剂量依赖性,高剂量组调脂效果优于低剂量组;桑叶水提取物+桑叶醇提取物以高剂量协同作用调脂效果最好。小鼠血清样品中检测出9个入血成分,鉴定了7个成分,其中3个原形成分,4个代谢产物,9个入血成分主要为黄酮类化合物。结论 黄酮类成分是桑叶提取物发挥调脂作用的主要成分。

关键词:桑叶提取物;调节血脂;血清药物化学;活性成分;小鼠

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)05-0075-04

Regulation Effect on Blood Lipids and Components Identification of Mulberry Leaves in Guangxi

ZENG Yu¹, LI Yuanjie¹, MA Jianxiong², CHEN Lu³

(1. Fourth Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Liuzhou Worker's Hospital, Liuzhou, Guangxi, China 545005; 2. Guangxi Jinhaitang Pharmaceutical Co., Ltd., Nanning, Guangxi, China 530313; 3. Guangxi Botanical Garden of Medical Plants, Nanning, Guangxi, China 530023)

Abstract: Objective To study the regulation effect on blood lipids and active components identification of mulberry leaves in Guangxi.

Methods Animal models of hyperlipidemia induced by Triton WR-1339 were established, the serum levels including total cholesterol(TC), triglyceride(TG), high-density lipoprotein cholesterol(HDL-C) and were low-density lipoprotein cholesterol(LDL-C) were determined to observe the effect of mulberry leaf water extract, mulberry leaf alcohol extract, mulberry leaf water extract + mulberry leaf alcohol extract on blood lipid regulation. Then the chemical components in serum were identified by HPLC-Q-TOF/MS method.

Results Each group of mulberry leaf extract had a certain effect on blood lipid regulation, and it was dose-dependent. The lipid-lowering effect of high-dose group was better than that of low-dose group; mulberry leaf water extract + mulberry leaf alcohol extract had the best synergistic effect on lipid-lowering at high doses. Nine blood components were detected in mouse serum samples, and seven components were identified, including three protoforms, four metabolites, and the nine blood components were mainly flavonoids. **Conclusion** Flavonoids are the main components of the mulberry leaf extract to exert lipid-lowering effects.

Key words: extraction of mulberry leaves; regulation of blood lipids; serum medicinal chemistry; active components; mice

桑叶为桑科植物 *Morus alba* L. 的干燥叶,桑叶及其制剂具有降血糖、降血压、抗菌、抗病毒等多种药理活性^[1-4],但调节血脂方面的研究较少,特别是关于血清药物成分研究目前尚未见相关报道。广西是我国桑叶主产地之一,药材资源丰富,以桑叶为主药制成的药品制剂和药食两用的食品品类繁多,但质量参差不齐,其中药材质量标准不够完善是主要原因。本研究中对桑叶提取物调节血脂作用进行研究,对比了水提取物、醇提取物及水提取物+醇提取物混合给药的调脂效果,明确了桑叶提取物入血成分,为完善桑叶药材的质量标准及开发调脂类食品制剂提供参考。现报道如下。

1 仪器、试剂与动物

1.1 仪器

1260 型高效液相色谱仪(HPLC),G6530 型四级杆

串联飞行时间质谱(Q-TOF/MS)仪均购自美国安捷伦公司;Allegra 64R 型低温高速离心机(美国 Beckman 公司);EL204 型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器<上海>有限公司);Milli Q 超纯水仪(美国密理博公司);试剂盒(上海荣盛生物技术有限公司)。

1.2 试剂

桑叶采摘于广西南宁市郊,经广西中医药大学药用植物教研室韦松基教授鉴定为正品;桑叶提取物(实验室自制,为浓缩液冷冻干燥的粉末);银杏黄酮片(深圳海王药业有限公司,批号为 20161009);槲皮素对照品、山柰酚对照品、山柰酚芸香苷对照品、紫云英苷对照品、槲皮素芸香苷对照品、木犀草素芸香苷对照品、绿原酸对照品(批号分别为 201607,201611,201606,201607,201602,201606,201607,纯度均≥98%),均购自中国食

*基金项目:广西科学研究与技术开发计划项目[09321005];广西南宁市科技创新基金项目[20176101];广西南宁市青秀区重点研发计划项目[2017035]。

第一作者:曾瑜,女,硕士研究生,主管药师,主要从事医院药品质量研究工作,(电子信箱)522247532@qq.com。

△通信作者:陈路,硕士研究生,副主任药师,主要从事天然药物研究与开发工作,(电子信箱)328046345@qq.com。

品药品检定研究院; Triton WR-1339(美国 Sigma-Aldrich 公司); 乙腈为色谱纯(美国 Fisher 试剂公司), 其他试剂均为分析纯。

1.3 动物

160 只 SPF 级健康昆明种小鼠, 体重(20±2)g, 雌雄各半, 购于广西中医药大学实验动物中心(合格证号为桂医动字第 11005 号)。实验动物给予普通饲料分笼饲养 1 周以适应实验条件。饲养环境温度为 22~27℃, 相对湿度为 50%~70%。

2 方法与结果

2.1 调节血脂作用实验

2.1.1 急性高脂血症小鼠模型建立与给药

将实验小鼠随机分为正常对照组、模型对照组、实验组和阳性对照组, 模型对照组、实验组和阳性对照组分别尾静脉注射 Triton WR-1339(400 mg/kg)诱导血脂升高; 正常对照组注射等体积生理盐水。注射 Triton WR-1339 后 12 h, 实验组[水提物组、醇提物组、水提物组+醇提物组(1:3)]分别用桑叶提取物(10, 20, 40 mg/kg 3 个剂量组)灌胃, 阳性对照组以银杏黄酮(20 mg/kg)灌胃。给药后 6, 12 h, 每组各随机选取 10 只小鼠, 去眼球采血分离血清, 于-38℃保存, 备用。

2.1.2 血脂指标测定

按照试剂盒说明书进行操作, 分别测定各组血清样品中总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)及低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)的含量, 并计算 HDL-C/TC 及 HDL-C/LDL-C。采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析。数据以 $\bar{X} \pm s$ 表示, 组间比较用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

结果见表 1。与正常对照组相比, 其余各组小鼠注射 Triton WR-1339 后, 小鼠血清中 TC, TG, LDL-C 均较注射前分别升高 7.5, 6.4 倍, HDL-C/TC 和 HDL-C/LDL-C 分别降低 41% 和 12%, 可见小鼠造模成功。注射 Triton WR-1339 后 12 h, 各组小鼠血清中 TC, TG, LDL-C, LDL-C 水平比较, 无显著性差异($P > 0.05$)。实验组各组给药后 12 h, 桑叶水提物、桑叶醇提物和桑叶水提物+桑叶醇提物均能降低由 Triton WR-1339

诱发的高脂血症, 且呈剂量依赖性, 给药剂量越大效果越好。可见, 实验组 3 组中以混合给药调脂效果最好, 混合给药高剂量组的效果显著超过阳性对照组($P < 0.01$)。

2.2 血清药物成分分析

2.2.1 溶液制备

取桑叶水提物+桑叶醇提物(1:3)0.5106 g, 精密称定, 用 50% 甲醇溶解, 超声 10 min, 置离心机, 速率 13 000 r/min 离心 10 min, 取上清液作为供试品溶液。分别取 2.1.1 项下实验组(混合给药组)的小鼠血清置离心机重新, 速率 13 000 r/min 离心 10 min(25℃), 取上清液作为血清样品溶液。取山奈酚芸香苷等对照品适量, 精密称定, 置 10 mL 容量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 制成相应质量浓度的混合对照品溶液, 低温保存, 作为对照品溶液, 备用。

2.2.2 成分分析

色谱柱为 Agilent RRHD Eclipse Plus C₁₈ 柱(100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm), 流动相为 90% 乙腈(A)-0.2% 磷酸溶液(B)梯度洗脱[0~10 min 时 A-B(20:80), 10~20 min 时 A-B(30:70), 20~30 min 时 A-B(40:60)], 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 365 nm。质谱采用 AJS ESI 源, 扫描方式为正、负离子模式, 采集范围为 m/z 100~1 700。

取上述溶液, 按拟订色谱条件进样分析, 并结合文献及质谱信息初步确定桑叶提取物降血脂入血成分。结果见表 2 和图 1。在小鼠血清样品中检测出 9 个入血成分, 鉴定了 7 个成分, 其中 3 个原形成分, 4 个代谢产物。9 个入血成分主要为黄酮类化合物。

化合物 1: 在负离子模式下得到准分子离子 m/z 353.0, 碎片离子 m/z 191.3[M-162]⁻可能是奎尼酸的特征峰, 为准分子离子失去 1 分子咖啡酸基团而得, 推测为绿原酸的裂解途径, 通过与文献[5]及绿原酸对照品比较, 鉴定化合物 1 为绿原酸。

化合物 2: 准分子离子 m/z 611.0, 准分子离子失去 1 分子芸香糖后的碎片为 m/z 303.4, 是黄酮类化合物典型的裂解途径, 通过与文献[6]及槲皮素芸香苷对照品比较, 鉴定化合物 2 为槲皮素芸香苷。

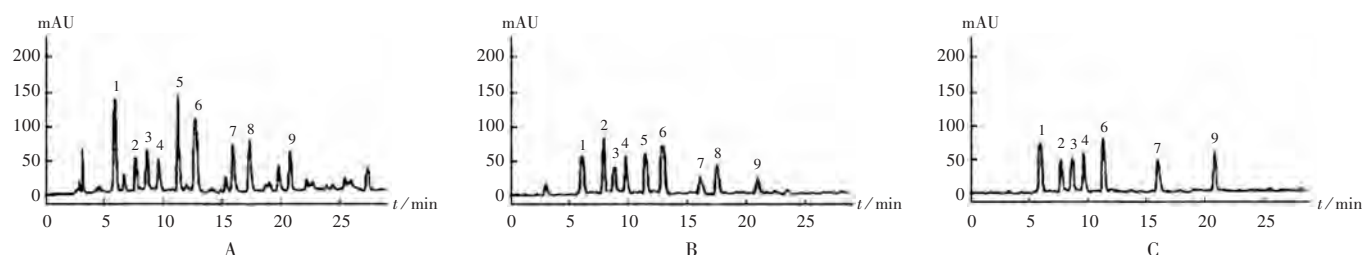
表 1 给药后 12 h 桑叶提取物对急性高脂血症小鼠血脂指标的影响($\bar{X} \pm s$, $n = 10$)

指标	正常对照组	模型组	阳性对照组	实验组(A/B/C)		
				水提物组	醇提物组	(水提物+醇提物)组
TC(mg/100 mL)	80.6±3.9	468.4±35.9 [*]	318.6±36.2	432.3±18.9/402.2±19.3/318.4±21.9 [#]	374.6±42.1/323.9±31.4/285.4±22.3 [#]	371.1±37.4/289.6±38.2/217.3±29.8 [#]
TG(mg/100 mL)	86.3±4.1	548.5±36.7 [*]	452.8±38.4	537.2±36.4/512.2±39.7/443.6±42.7 [#]	528.2±49.4/501.5±49.1/421.7±26.8 [#]	508.2±24.7/451.4±31.7/398.3±35.4 [#]
LDL-C(mg/100 mL)	73.2±5.7	321.3±23.8 [*]	230.7±18.3	296.3±21.5/279.8±26.5/223.6±25.3 [#]	258.7±28.6/224.5±21.2/201.2±10.1 [#]	257.9±19.5/203.8±13.2/163.6±21.7 [#]
HDL-C/TC	0.54±0.03	0.35±0.02 [*]	0.39±0.03	0.35±0.03/0.36±0.04/0.38±0.03	0.36±0.03/0.37±0.04/0.39±0.03	0.37±0.04/0.39±0.05/0.43±0.03 [#]
HDL-C/LDL-C	0.59±0.04	0.51±0.02	0.55±0.02	0.51±0.03/0.52±0.02/0.54±0.02	0.52±0.02/0.53±0.03/0.55±0.02	0.53±0.03/0.55±0.04/0.57±0.05

注: 与正常对照组相比, ^{*} $P < 0.01$; 与模型组相比, [#] $P < 0.05$; 实验组 A/B/C 给药剂量分别为 10, 20, 40 mg/kg。

表2 桑叶提取物入血成分谱峰信息归属

序号	化合物	t_R (min)	分子式	离子类型	相对分子质量	质谱离子碎片(m/z)	来源
1	绿原酸	5.8	$C_{16}H_{18}O_9$	$[M-H]^-$	354.3	353.0;191.3;179.1;135.2	原形
2	槲皮素芸香苷	7.6	$C_{27}H_{30}O_{16}$	$[M+H]^+$	610.5	612.0;611.0;465.1;303.4	代谢产物
3	木犀草素芸香苷	8.2	$C_{27}H_{30}O_{16}$	$[M+H]^+$	610.5	612.2;611.0;449.1;287.4	代谢产物
4	山柰酚芸香苷	9.8	$C_{27}H_{30}O_{15}$	$[M+H]^+$	594.5	596.0;595.0;449.2;287.1	代谢产物
5	紫云英苷	11.6	$C_{21}H_{20}O_{11}$	$[M+H]^+$	448.4	450.2;449.0;287.4	代谢产物
6	未知	12.8	$C_{16}H_{18}O_8$	$[M-H]^-$	338.2	337.0;177.2;158.1	原形
7	槲皮素	16.2	$C_{15}H_{10}O_7$	$[M+H]^+$	302.2	304.1;303.0;287.3	原形
8	未知	17.4	$C_{16}H_{12}O_5$	$[M-H]^-$	283.1	282.0;265.2;255.5	原形
9	山柰酚	20.6	$C_{15}H_{10}O_6$	$[M+H]^+$	286.2	288.2;287.0;271.2	原形



A. 供试品溶液 B. 血清样品溶液 C. 混合对照品溶液

图1 高效液相色谱图

化合物3:准分子离子 m/z 611.0,推断为化合物2的同分异构体,准分子离子失去1分子芸香糖后再失去1个 $O\cdot$ 得到碎片离子 m/z 287.4,通过与文献[6]及木犀草素芸香苷对照品比较,鉴定化合物3为木犀草素芸香苷。

化合物4:准分子离子 m/z 595.0,其余碎片离子与化合物3相似,推测化合物4是由化合物3失去1个 $O\cdot$ 而得,通过与文献[7]及山柰酚芸香苷对照品比较,鉴定化合物4为山柰酚芸香苷。

化合物5:准分子离子 m/z 449.0,有1个 m/z 287.4的碎片离子,与化合物3和4相似,推测化合物5由化合物3或化合物4失去1分子呋喃糖(m/z 162.0)而得,通过与文献[8]及紫云英苷对照品比较,鉴定化合物5为紫云英苷。

化合物7和化合物9:两者的准分子离子峰在化合物2和4的碎片离子中均有出现,推测为化合物2和4的母核,通过与文献[5]及槲皮素、山柰酚对照品比较,鉴定化合物7为槲皮素,化合物9为山柰酚。

3 讨论

血清药物化学于1989年由日本学者田代真一提出,是血清中药效物质较科学、有效的研究方法,也是中药药效物质基础研究的重要手段。近年来,该研究方法在国内迅速发展,许多专家、学者做了大量的研究,为阐明中药物质基础及作用机制作出了贡献^[9-10]。高脂血症是导致动脉粥样硬化和冠状动脉粥样硬化性心脏病(简称冠心病)等心脑血管疾病的危险因素之一,是中老年人的常见病、多发病^[11]。现代研究发现,桑叶提取物能显著

拮抗急性高脂血症小鼠中的TC,TG,HDL-C升高,对动脉粥样硬化和冠心病等疾病有一定的预防作用^[12-14]。血清药物分析能精准确定发挥药效的具体物质成分,在中药研究方面也初见成效,对药材质量标准的完善和深度开发有重要作用^[15-16]。

本研究中仍有几个值得注意的问题。一是在进行调节血脂实验时,混合给药组的水提物与醇提物的混合比例。在前期实验中曾尝试了水提物+醇提物(1:1,1:2,1:3,2:1,3:1)多种混合比例,发现混合比例不同调脂效果不一样,其中以水提物+醇提物(1:3)效果最好。二是血清的取样和采集时间。有学者在研究血药成分时直接用健康小鼠给药后采集血清,因涉及健康体和带病体对药物摄取是否一致,科学性还需要进行更深入的研究探讨。为保证实验条件的一致性和更具有针对性,本研究中采用的是给药后6h的小鼠血清,此时血药浓度最高,对血药成分分析较有利。三是在成分鉴定方面,血清中同时检测出黄酮苷和苷元。但从图谱信息来看,苷元的含量极少,可能是尚未代谢完成的遗留成分。另有2个化合物尚未鉴定出来,但根据生源途径及离子碎片分析,初步推测为黄酮类或绿原酸衍生物,将在下一步工作结合更多的色谱技术对其进行解析。

参考文献:

- [1] 孟庆海,殷秋忆,郭静,等. 4种不同桑叶提取物降血糖作用的筛选[J]. 中成药,2014,36(6):1288-1291.
- [2] LI YG,JI DF,ZHONG S,et al. Hybrid of 1-deoxynojirimycin and polysaccharide from mulberry leaves treat diabetes mellitus by