

正交试验优选桑籽中总生物碱、总黄酮及粗多糖的提取工艺

吕志强¹, 李乔², 刘洪玲¹, 田景振^{3*}

1. 青岛大学附属医院药剂科, 山东 青岛 266000;
2. 青岛酒店管理职业技术学院, 山东 青岛 266000;
3. 山东中医药大学药学院, 济南 250355)

[摘要] 目的: 优选桑籽中总生物碱、总黄酮及粗多糖的提取工艺。方法: 将桑籽脱脂后, 以总生物碱、总黄酮及粗多糖提取量的综合评分为指标, 在单因素试验基础上, 通过正交试验考察提取时间、乙醇体积分数及盐酸摩尔浓度对提取工艺的影响。总黄酮、总生物碱及粗多糖的含量测定依次采用 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 法、雷氏盐比色法及蒽酮-硫酸法。结果: 最佳提取工艺为提取时间 2 h, 乙醇体积分数 50%, 盐酸摩尔浓度 $0.03 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 总生物碱、总黄酮及粗多糖平均提取量分别为 23.15, 0.57, $0.51 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。结论: 该工艺稳定可行, 提取效率高, 适用于工业化生产, 为桑籽资源的开发利用提供参考。

[关键词] 桑籽; 总生物碱; 总黄酮; 多糖类; 正交试验; 雷氏盐比色法

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)14-0027-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014140027

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140528.1140.003.html>

[网络出版时间] 2014-05-28 11:40

Optimization of Extraction Process for Total Alkaloids, Total Flavonoids, Polysaccharides from Mulberry Seeds by Orthogonal Test

LV Zhi-qiang¹, LI Qiao², LIU Hong-ling¹, TIAN Jing-zhen^{3*}

1. Department of Pharmacy, the Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266000, China;
2. Qingdao Hotel Management College, Qingdao 266000, China;
3. College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction process of total alkaloids, total flavonoids and polysaccharides from mulberry seeds. **Method:** After mulberry seeds was defatted, with composite score of extracting amounts of total alkaloids, total flavonoids and polysaccharides as indicators, on the basis of single factor tests, orthogonal design was adopted to optimize extraction process by taking extracting time, ethanol concentration, hydrochloric acid concentration as factors. Contents of total flavonoids, total alkaloids and polysaccharides were determined by $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$, reinecke salt colorimetry and anthrone-sulfuric acid method, respectively. **Result:** Optimum extraction conditions were as follows: extracting time 2 h, ethanol concentration 50%, molar concentration of hydrochloric acid $0.03 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; average extracting amounts of total alkaloids, total flavonoids and polysaccharides were 23.15, 0.57, $0.51 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$. **Conclusion:** This optimized extraction process was stable, feasible and suitable for industrial production with high extraction efficiency, it could provide a reference for development and utilization of mulberry seeds resources.

[Key words] mulberry seeds; total alkaloids; total flavonoids; polysaccharides; orthogonal test; reinecke salt colorimetry

[收稿日期] 20131101(020)

[基金项目] 山东省教育厅科研发展计划项目(J12LM58)

[第一作者] 吕志强, 硕士, 初级药剂师, 从事中药制剂研究, Tel:18661805672, E-mail:lvzhiqiang10000@126.com

[通讯作者] * 田景振, 教授, 博士生导师, 从事中药新剂型、新技术研究, Tel:0531-89628597, E-mail:tianjingzhen@163.com

目前有关桑类药材降血糖活性成分及其作用机制的研究多集中于桑叶、桑白皮、桑枝、桑葚,对桑籽的研究较少。桑籽中降血糖成分包括生物碱、黄酮及多糖^[1],但该活性成分的提取常只针对其中一类成分^[2-4]。生物碱类成分的常用提取溶剂为盐酸乙醇^[2]、乙醇水^[5]和酸水^[6]等溶液;黄酮类的提取常采用乙醇水溶液^[7];多糖类成分常选择水为提取溶剂^[8]。为最大程度提高废弃桑籽的经济可利用性并满足市场对其提取物的需求,本实验以总生物碱、总黄酮、粗多糖提取量为综合评价指标,采用单因素试验和正交试验优选桑籽提取工艺。

1 材料

UV3010型紫外分光光度仪(日本日立),H1850R型台式高速冷冻离心机(湘仪离心机仪器有限公司),PHS-3C型精密pH计(上海三信仪表厂),BS110S型电子分析天平(德国赛多利斯公司),XP205型1/10万电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司),SYC-15型超级恒温水浴箱(南京桑力电子设备厂),L-2000型高效液相色谱仪(日本日立),Diamonsil C₁₈色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm, 北京迪马科技有限公司)。

桑籽购于山东省蚕业研究所,经山东中医药大学周凤琴教授鉴定为桑科植物桑 *Morus alba* L. 成熟果实的种子,样品分装后于4℃贮存;2-甲基哌啶对照品(上海晶纯试剂有限公司,批号22931),芦丁对照品(中国食品药品检定研究院,批号760706),葡萄糖对照品(莱阳化工实验厂,批号2009021605),雷氏盐(国药集团化学试剂有限公司),蒽酮(天津市科密欧化学试剂开发中心),试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备与测定 将桑籽自然风干,粉碎过40目,置索氏提取器中,加正己烷脱脂,药渣挥干溶剂。精密称取适量药渣,加盐酸-乙醇混合液浸提,滤过,滤液旋转蒸发无醇味,离心(8 000 r·min⁻¹, 15 min, 下同),取上清液定容于量瓶中,得总黄酮和总生物碱供试品溶液。精密吸取该供试品溶液适量,加无水乙醇至醇体积分数80%,于4℃放置24 h,取出,过滤,加无水乙醇洗涤沉淀,加热水溶解,离心,取上清液,定容,得粗多糖供试品溶液,置于低温处保存。总黄酮、总生物碱及粗多糖的含量测定分别采用Al(NO₃)₃法^[9]、雷氏盐比色法^[10]及蒽酮-硫酸法^[1]。

2.2 单因素试验考察

2.2.1 提取溶剂 精密称取脱脂桑籽粉3份,每份5 g,分别加入0.01 mol·L⁻¹盐酸水溶液、30%乙醇及0.01 mol·L⁻¹盐酸-30%乙醇溶液各30 mL于80℃浸提2次,每次1 h,计算提取量,结果总生物碱依次为18.92, 6.57, 20.21 mg·g⁻¹,总黄酮分别为0.32, 0.85, 0.84 mg·g⁻¹,粗多糖分别为0.77, 0.69, 0.76 mg·g⁻¹,综合各指标成分考虑,选择0.01 mol·L⁻¹盐酸-50%乙醇溶液为提取溶剂。

2.2.2 提取时间 精密称取脱脂桑籽粉5份,每份5 g,各加入0.01 mol·L⁻¹盐酸-30%乙醇溶液30 mL于80℃浸提2次,每次分别为0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 h,计算提取量,结果总生物碱分别为6.16, 14.75, 16.61, 20.21, 13.75 mg·g⁻¹,总黄酮分别为0.58, 0.68, 0.68, 0.84, 0.84 mg·g⁻¹,粗多糖依次为0.62, 0.67, 0.76, 0.76, 0.75 mg·g⁻¹,表明每次提取2.0 h时各指标成分提取量最大。

2.2.3 乙醇体积分数 精密称取脱脂桑籽粉4份,每份5 g,分别加入0.01 mol·L⁻¹盐酸-乙醇混合液(乙醇体积分别为10%, 30%, 50%, 70%) 30 mL于80℃浸提2次,每次2 h,计算提取量,结果总生物碱依次为8.92, 20.21, 16.20, 10.01 mg·g⁻¹,总黄酮分别为0.45, 0.84, 0.86, 0.86 mg·g⁻¹,粗多糖依次为0.85, 0.76, 0.59, 0.51 mg·g⁻¹,表明随乙醇体积分数的增加,总黄酮提取量逐渐增加,总生物碱提取量于30%时达最大值,而粗多糖则逐渐降低。

2.2.4 盐酸浓度 精密称取脱脂桑籽粉5份,每份5 g,分别加入0, 0.01, 0.03, 0.05, 0.07 mol·L⁻¹盐酸-30%乙醇溶液30 mL于80℃浸提2次,每次2.0 h,计算提取量,结果总生物碱分别为6.57, 20.21, 21.52, 22.21, 15.17 mg·g⁻¹,总黄酮依次为0.85, 0.84, 0.76, 0.77, 0.45 mg·g⁻¹,粗多糖分别为0.69, 0.76, 0.67, 0.68, 0.63 mg·g⁻¹。

2.2.5 溶剂用量 精密称取脱脂桑籽粉4份,每份5 g,分别加入0.01 mol·L⁻¹盐酸-30%乙醇溶液20, 30, 40, 50 mL于80℃浸提2次,每次2.0 h,计算提取量,结果总生物碱分别为6.09, 22.01, 20.26, 20.18 mg·g⁻¹,总黄酮依次为0.70, 0.84, 0.86, 0.85 mg·g⁻¹,粗多糖分别为0.62, 0.76, 0.77, 0.60 mg·g⁻¹,故选择溶剂用量6倍。

2.3 正交试验优选 在单因素试验基础上,选择提取时间、乙醇体积分数及盐酸摩尔浓度为考察因素,以总生物碱、总黄酮、粗多糖提取量的综合评分为指

标,权重系数分别为 0.4,0.3,0.3。精密称取脱脂桑籽粉 9 份,每份 100 g,各加入 6 倍量盐酸-乙醇混合液于 80 ℃浸提 2 次,按 $L_9(3^4)$ 正交表进行试验,因素水平见表 1,试验安排及结果见表 2,方差分析见表 3。

表 1 桑籽提取工艺正交试验因素水平

水平	A 提取时间 /h	B 乙醇 /%	C 盐酸 /mol·L ⁻¹
1	1	10	0.01
2	2	30	0.03
3	3	50	0.05

表 2 桑籽提取工艺正交试验安排及直观分析

No.	A	B	C	D(空白)	总生物碱 /mg·g ⁻¹	总黄酮 /mg·g ⁻¹	粗多糖 /mg·g ⁻¹	综合评分
1	1	1	1	1	12.27	0.44	0.84	5.29
2	1	2	2	2	18.46	0.72	0.71	7.81
3	1	3	3	3	17.76	0.71	0.62	7.50
4	2	1	2	3	21.95	0.70	0.83	9.24
5	2	2	3	1	22.21	0.77	0.68	9.32
6	2	3	1	2	16.20	0.88	0.69	6.95
7	3	1	3	2	20.65	0.40	0.82	8.63
8	3	2	1	3	13.75	0.84	0.75	5.98
9	3	3	2	1	24.60	0.76	0.57	10.24
K_1	6.87	7.72	6.07	8.28				
K_2	8.50	7.70	9.10	7.80				
K_3	8.28	8.23	8.48	7.57				
R	1.63	0.53	3.03	0.71				

表 3 综合评分方差分析

方差来源	SS	f	MS	F	P
A	4.73	2	2.37	5.99	>0.05
B	0.54	2	0.27	0.68	>0.05
C	15.32	2	7.66	19.38	<0.05
D(误差)	0.79	2	0.40	1.00	

注: $F_{0.05}(2,2) = 19$ 。

由直观分析知,各因素对桑籽有效成分提取效果的影响顺序为 $C > A > B$ 。方差分析表明 C 因素对提取工艺具有显著性影响,其他因素则无显著性影响,综合生产成本考虑,确定最佳提取工艺组合 $A_2B_3C_2$,即提取时间 2 h,乙醇体积分数 50%,盐酸摩尔浓度 0.03 mol·L⁻¹。

2.4 验证试验 按优选的提取工艺进行 3 次重复试验,结果总生物碱、总黄酮、粗多糖的平均提取量分别为 23.15, 0.57, 0.51 mg·g⁻¹, RSD 分别为 0.713%, 2.667%, 3.014%,表明该工艺稳定可行。

3 讨论

桑类资源中降血糖的有效成分为生物碱类、黄

酮类、多糖类,通过降糖效果的显著性确定各指标的权重系数^[9,11],采用综合评分法优选提取工艺,以确保各有效成分得率达到最优。采用 $Al(NO_3)_3$ 法测定总黄酮含量时,发现加入 NaOH 后会有生物碱沉淀析出,需通过离心将沉淀除去。桑籽中生物碱类、黄酮类、多糖类成分进行合并提取,避免了能源浪费,且优选的工艺条件稳定性较好。

[参考文献]

- [1] 李凡. 中药桑叶质量评价及活性部位的纯化工艺研究[D]. 杭州:浙江大学,2007.
- [2] 李凡,裘雅渔,钱文春,等. 桑叶中总生物碱和 1-脱氧野尻霉素的含量考察[J]. 中国药学杂志,2008,43(3):176.
- [3] 高静,吕志强,周长凯,等. 正交设计优选桑籽总黄酮提取工艺的研究[J]. 齐鲁药事,2012,31(12):687.
- [4] 孟凡刚,吕志强,崔清华,等. 正交设计优选桑籽总多糖提取工艺的研究[J]. 食品与药品,2013,15(2):117.
- [5] 李宇亮,李剑敏,吴雅睿. 1-脱氧野尻霉素提取分离方法研究[J]. 应用化工,2006,35(9):659.

不同增溶剂的参麦注射液稳定性考察

胥勤*, 余建军, 熊晓明, 胡雄, 廖远征, 姚欣, 陈开军
(四川升和药业股份有限公司, 成都 611130)

[摘要] **目的:**考察不同增溶剂制备的参麦注射液的稳定性,探索参麦注射液中聚山梨酯 80 的替代品。**方法:**分别以 15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯(0.2%)和聚山梨酯 80(0.5%)为增溶剂制备参麦注射液,以外观形状、不溶性微粒、可见异物、指纹图谱相似度、pH、人参皂苷类成分含量为检测指标,考察参麦注射液的影响因素试验(光照、高温、低温、冻融)、25℃长期稳定性试验及 40℃加速试验。采用 UV 测定总皂苷含量,检测波长 544 nm;利用 HPLC 测定人参皂苷类成分含量,流动相乙腈(A)-水(B)梯度洗脱(0~30 min,0%~10% A;30~40 min,10%~23% A;40~50 min,23% A;50~85 min,23%~60% A;85~95 min,60%~100% A),检测波长 203 nm。**结果:**不同增溶剂制备的参麦注射液外观形状、不溶性微粒及可见异物均符合规定,指纹图谱相似度均为 0.98,人参皂苷类成分含量无明显差异。**结论:**15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯与聚山梨酯 80 具备等同增溶效果,制备的参麦注射液稳定性良好。

[关键词] 参麦注射液;红参;麦冬;15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯;增溶剂;总皂苷;人参皂苷类成分

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)14-0030-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2014140030

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140528.1139.002.html>

[网络出版时间] 2014-05-28 11:39

Investigation of Stability of Shenmai Injections with Different Solubilizer

XU Qin*, YU Jian-jun, XIONG Xiao-ming, HU Xiong, LIAO Yuan-zheng, YAO Xin, CHEN Kai-jun
(Sichuan Sunnyhope Pharmaceutical Co. Ltd, Chengdu 611130, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate stability of Shenmai injections with different solubilizer and explore a solubilizer for replacing polysorbate 80. **Method:** Shenmai injections was prepared with 15-hydroxy polyethylene glycol stearate (0.2%) and polysorbate 80 (0.5%) as solubilizer, respectively. With appearance, insoluble particles, visible particles, fingerprint similarity, pH and content of ginsenosides as indexes, stability of Shenmai injections was investigated, including influencing factor test (lighting, high temperature, low temperature, freezing and thawing), long-term stability test in 25℃ and acceleration test in 40℃. UV was adopted to

[收稿日期] 20131030(003)

[基金项目] 四川省科技型中小企业早期科技创新省级扶持项目(14KCBZ0147)

[通讯作者] *胥勤, 学士, 工程师, 执业药师, 从事药品质量管理研究, Tel:028-67204985, E-mail:389927173@qq.com

- [6] 周惠燕, 胡晓渝, 马英. 桑叶中 1-脱氧野尻霉素的纯化及含量测定[J]. 中国现代应用药学杂志, 2008, 25(5):367.
- [7] 高中松, 彭密军, 高亮, 等. 桑叶黄酮的提取分离纯化研究[J]. 安徽农学通报, 2005, 11(6):48.
- [8] 刘军海, 黄宝旭, 许恩庆. 桑叶多糖提取工艺研究[J]. 中国食品添加剂, 2009(5):90.
- [9] 李琴, 徐建国, 刘姐. 桑椹籽中黄酮的提取工艺研究[J]. 农业与技术, 2008, 28(4):61.
- [10] 李凡, 裘雅渔, 钱文春, 等. 桑叶中总生物碱和 1-脱氧野尻霉素的含量考察[J]. 中国药学杂志, 2008, 43(3):177.
- [11] 殷浩. 桑树和家蚕对 DNJ 的富集规律及桑籽降血糖作用研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2009.

[责任编辑 刘德文]