

正交试验优选银桑降糖颗粒中桑叶的提取工艺

柴尧, 彭九嫚, 陆杰霖, 董文南, 刘睿, 吴皓, 程建明*

(南京中医药大学 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心,
江苏省海洋药用生物资源研究与开发重点实验室, 南京 210023)

[摘要] 目的: 优选银桑降糖颗粒中桑叶的提取工艺, 为该制剂的研发提供参考。方法: 以芦丁提取量为指标, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验考察乙醇体积分数及用量、提取时间对桑叶醇提取工艺的影响; 以 1-脱氧野尻霉素(DNJ) 相对提取率为指标, 通过 $L_9(3^3)$ 正交试验考察加水量及煎煮时间对桑叶水煎煮工艺的影响。采用 HPLC 测定芦丁含量, 检测波长 358 nm, 流动相甲醇(A)-0.5% 磷酸溶液(B) 梯度洗脱(0~5 min, 30% A; 5~10 min, 30%~35% A; 10~15 min, 35%~40% A; 15~18 min, 40%~50% A); 利用茚甲氧羰酰氯柱前衍生 HPLC-UV 测定 DNJ 含量。结果: 最佳醇提工艺为加 20 倍量 60% 乙醇提取 1 次, 提取时间 1.5 h; 芦丁提取量 $1.22 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。最佳水煎煮工艺为分别加 30, 25 倍量水煎煮 2 次, 煎煮时间依次为 1.0, 0.5 h; DNJ 相对提取率 88.06%。结论: 优选的提取工艺稳定可行, 可兼顾桑叶中黄酮类、生物碱类成分的提取。

[关键词] 银桑降糖颗粒; 芦丁; 1-脱氧野尻霉素; 衍生化反应

[中图分类号] R283.6; R284.2; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)24-0006-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2014240006

Optimization of Extraction Process for Mori Folium Leaves in Yinsang Jiangtang Granules by Orthogonal Test

CHAI Yao, PENG Jiu-man, LU Jie-lin, DONG Wen-nan, LIU Rui, WU Hao, CHENG Jian-ming*

(Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization,
Jiangsu Key Laboratory of Research and Development in Marine Bio-resource
Pharmaceutics, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize extraction process of Mori Folium leaves in Yinsang Jiangtang granules. **Method:** Taking extracting amount of rutin as index, $L_9(3^4)$ orthogonal design was adopted to optimize alcohol extraction technology with extraction time, ethanol amount and concentration as factors. With relative yield of 1-deoxynojirimycin (DNJ) as index, $L_9(3^3)$ orthogonal design was used to optimize water extraction technology by taking solid-liquid ratio and extraction time as factor. The content of rutin was determined by HPLC, detection wavelength was 358 nm, mobile phase consisted of methanol (A) -0.5% phosphoric acid solution (B) for gradient elution (0-5 min, 30% A; 5-10 min, 30%-35% A; 10-15 min, 35%-40% A; 15-18 min, 40%-50% A). The contents of DNJ were detected by precolumn derivation HPLC-UV method with FMO-CI as reagent. **Result:** Optimum alcohol extraction process was as following: extracted twice with 20 times the amount of 60% ethanol for 1.5 h; extracting amount of rutin was $1.22 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$. Optimum water extraction process was extracted twice for 1.0, 0.5 h with 30, 25 times the amount of water; relative yield of DNJ was 88.06%. **Conclusion:** These optimized extraction technologies are stable and feasible, it can balance extraction of flavonoids and alkaloids

[收稿日期] 20140710(010)

[基金项目] 国家高技术研究发展计划项目(863 计划)(2013AA093003); 国家海洋公益性行业科研专项(201305007, 201405017); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(ysxk-2010)

[第一作者] 柴尧, 在读硕士, 从事中药新剂型、新技术及其产品研发, Tel: 18252067257, E-mail: 535694200@qq.com

[通讯作者] * 程建明, 博士, 研究员, 从事中药新剂型、新技术及其产品研发, E-mail: cjm7895@163.com

in Mori Folium.

[Key words] Yinsang Jiangtang granules; rutin; 1-deoxynojirimycin; derivatization reaction

银桑降糖颗粒是基于传统中医药理论,以辨证论治^[1]为指导,将具有降血糖活性的海洋中药四角蛤蚧粗多糖与桑叶提取物进行相须配伍,制成以四角蛤蚧为主、桑叶为辅,用于治疗糖尿病的海洋六类新药。前期研究表明四角蛤蚧降血糖的活性部位为水提醇沉粗多糖,与桑叶活性成分差异较大,故考虑将两者分开提取。药理研究证实桑叶降血糖的主要药效成分为生物碱类^[2]和黄酮类^[3]成分。目前,桑叶的提取溶剂常选择乙醇水^[4]、酸水^[5]和盐酸乙醇^[6]等,此类溶剂通常只针对药材中某一类药效成分提取效果较好,造成了其他有效成分的损失;此外,加入酸水提取,可能使得1-脱氧野尻霉素(1-deoxynojirimycin, DNJ)的衍生物和某些黄酮类成分发生水解,影响药效。本实验以最大程度兼顾黄酮和生物碱两类活性成分的提取率为原则,采用先醇提取再水煎煮的工艺路线,以黄酮类成分芦丁的提取量和生物碱类成分DNJ的相对提取率为评价指标,通过正交试验优化银桑降糖颗粒中桑叶的提取工艺,为该制剂的研究与开发提供实验依据。

1 材料

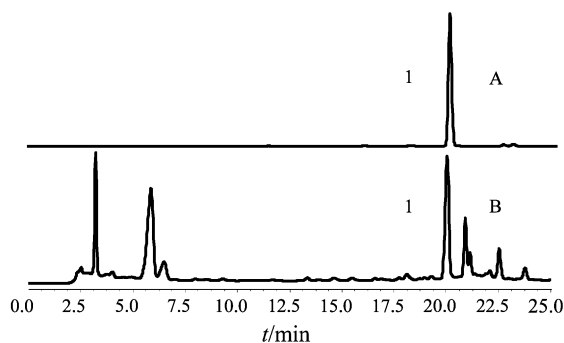
Unique-s15型超纯水系统(北京佰亿新创科技有限公司),DW-2型调温电热器(南通市通州申通电热器厂),e2695型高效液相色谱仪(2998型紫外检测器,美国Waters公司),YP6002型电子天平(上海光正医疗器械有限公司),BP211D型电子天平(德国赛多利斯公司)。

桑叶药材购自亳州市中药饮片厂(批号130101),经南京中医药大学吴启南教授鉴定为桑科植物桑 *Morus alba* 的干燥叶,符合《中国药典》2010年版一部相关项下规定。芦丁和1-脱氧野尻霉素(DNJ)对照品(大连美仑生物有限公司,批号分别为20130401,20120725),乙腈、甲醇为色谱纯,水为蒸馏水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 芦丁的含量测定

2.1.1 色谱条件^[7] Kromasil 100-5 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),检测波长 358 nm,柱温 30 ℃,流动相甲醇(A)-0.5%磷酸溶液(B)梯度洗脱(0~5 min, 30% A; 5~10 min, 30%~35% A; 10~15 min, 35%~40% A; 15~18 min, 40%~50% A),流速 1.0 mL·min⁻¹,见图1。



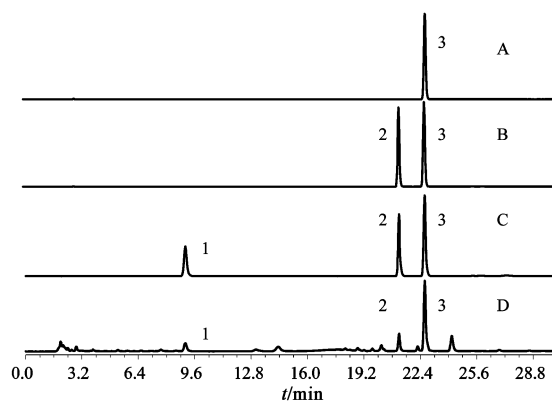
A. 对照品; B. 供试品; 1. 芦丁

图1 桑叶醇提取物 HPLC

2.1.2 对照品溶液的制备 精密称定芦丁对照品 3.54 mg 置于 50 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,摇匀,即得 0.067 3 g·L⁻¹对照品溶液。

2.2 DNJ的含量测定

2.2.1 色谱条件 Hedera ODS-2 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),检测波长 265 nm,柱温 30 ℃,流动相乙腈-0.1%磷酸(35:65),流速 1.0 mL·min⁻¹,见图2。



A. 茚甲氧羰酰基; B. 空白样品; C. 对照品; D. 供试品;

1. FMOC-DNJ; 2. FMOC-Gly; 3. FMOC-OH

图2 桑叶中DNJ衍生化反应物 HPLC

2.2.2 对照品溶液配制 精密称取 DNJ 对照品 3.02 mg 置于 10 mL 量瓶中,用 50% 乙腈溶解并定容至刻度,摇匀,得 0.296 g·L⁻¹对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密称取桑叶药材粉末(过三号筛)约 1 g,置 50 mL 锥形瓶中,加水 15 mL,于 80 ℃ 加热回流 30 min,滤过;滤渣加水 15 mL 同法提取 2 次,合并滤液,转移至 50 mL 量瓶中,加水定容至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,备用。

2.2.4 衍生化反应^[8] 取 BBS 缓冲液 (pH 8.5)

100 μL 置于 1.5 mL 离心管中,加入供试品溶液和含 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 芴甲氧羰酰氯 (FMO-CI) 的乙腈溶液各 200 μL , 涡旋 10 s, 混匀, 于 20 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 30 min, 加入 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘氨酸 (Gly) 100 μL 和 5% 冰乙酸 400 μL , 涡旋 10 s, 混匀, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 按 2.2.1 项下色谱条件测定 ($n=3$), 计算桑叶中 DNJ 质量分数 0.34 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

2.3 桑叶提取工艺路线优选 准确称取桑叶药材 (切碎) 20.0 g, 共 3 份, 分别加入 30 倍量水, 20 倍量 50% 乙醇, 20 倍量 75% 乙醇溶液 + 30 倍量水加热回流提取 1.0 h, 提取数 2 次, 过滤, 合并滤液, 取样, 按 2.1 和 2.2 项下方法检测, 结果芦丁提取量分别为 0.15, 1.18, 0.99 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, DNJ 相对提取率分别为 95.81%, 51.11%, 71.40%, 说明桑叶醇提后药渣再水煎煮的工艺线路能很好地保留主要活性成分。

2.4 乙醇提取工艺优选 以芦丁提取量为指标, 选择乙醇体积分数、加醇量及提取时间为考察因素, 在单因素试验基础上, 每个因素选择 3 个水平。准确称取桑叶药材 (切碎) 30.0 g, 共 9 份, 按 $L_9(3^3)$ 正交表进行试验, 试验安排及结果见表 1, 方差分析见表 2。

表 1 银桑降糖颗粒中桑叶乙醇提取工艺正交试验安排及直观分析

No.	A 乙醇体积分数/%	B 加醇量 / 倍	C 提取时间 / h	D(空白)	芦丁提取量 / $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
1	50	10	1.0	1	0.87
2	50	15	1.5	2	1.03
3	50	20	2.0	3	1.19
4	60	10	1.5	3	1.08
5	60	15	2.0	1	1.16
6	60	20	1.0	2	1.13
7	70	10	2.0	2	1.02
8	70	15	1.0	3	1.03
9	70	20	1.5	1	1.25
K_1	1.030	0.990	1.010	1.093	
K_2	1.123	1.073	1.120	1.060	
K_3	1.100	1.190	1.123	1.100	
R	0.093	0.200	0.113	0.040	

由直观分析可知, 各因素对醇提工艺的影响顺序为 $B > C > A$ 。方差分析表明因素 B 具有显著性影响, 其他因素则均无显著性影响。综合生产成本等考虑, 确定桑叶的醇提取工艺为加 20 倍量 60%

表 2 醇提工艺方差分析

方差来源	SS	MS	F	P
A	0.014	0.007	4.667	>0.05
B	0.061	0.031	20.333	<0.05
C	0.025	0.013	8.333	>0.05
D(误差)	0.003	0.002	1.000	

注: $F_{0.05}(2,2) = 19$ (表 4 同)。

乙醇溶液回流提取 1.5 h。

2.5 水煎煮工艺优选 以 DNJ 相对提取率为评价指标, 在单因素试验基础上, 选择加水量及煎煮时间为考察因素, 每个因素选择 3 个水平。准确称取桑叶药材 (切碎) 25.0 g, 共 9 份, 按 $L_9(3^3)$ 正交表进行试验, 试验安排及结果见表 3, 方差分析见表 4。由直观分析可知, 各因素对提取工艺的影响顺序为 $A > B$ 。方差分析表明因素 A 具有显著性影响, 因素 B 则无显著性影响, 综合生产成本等考虑, 确定桑叶水煎煮工艺为加 30, 25 倍量水回流提取 2 次, 提取时间分别为 1.0, 0.5 h。

表 3 银桑降糖颗粒中桑叶水煎煮工艺正交试验安排及直观分析

No.	A 加水量 / 倍	B 提取时间 / h	C(空白)	DNJ 相对提取率/%
1	30 + 25	1.5 + 1.0	1	83.09
2	30 + 25	1.0 + 0.5	2	81.09
3	30 + 25	0.5 + 0.5	3	80.28
4	25 + 20	1.5 + 1.0	2	78.73
5	25 + 20	1.0 + 0.5	3	76.13
6	25 + 20	0.5 + 0.5	1	75.83
7	20 + 15	1.5 + 1.0	3	75.14
8	20 + 15	1.0 + 0.5	1	73.06
9	20 + 15	0.5 + 0.5	2	65.95
K_1	81.487	78.987	77.327	
K_2	76.897	76.760	75.257	
K_3	71.383	74.020	77.183	
R	10.104	4.967	2.070	

表 4 水煎煮工艺方差分析

方差来源	SS	MS	F	P
A	153.542	76.771	19.152	<0.05
B	37.133	18.567	4.632	>0.05
C(误差)	8.017	4.009	1.000	

2.6 验证试验 称取桑叶药材(切碎)200.0 g,共3份,加入20倍量60%乙醇浸泡0.5 h,加热回流提取1.5 h,过滤;药渣加30倍量水回流提取(微沸)1.0 h,过滤;药渣加25倍量水回流提取(微沸)0.5 h。结果芦丁平均提取量 $1.22 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (RSD 0.75%), DNJ 相对提取率平均值 88.06% (RSD 2.27%),说明优选的工艺稳定可行。

3 讨论

药材中黄酮类成分常选择热水提取,但此类方法只适用于黄酮苷类成分的提取。桑叶中黄酮类成分除了黄酮苷类外,还存在大量黄酮苷元,这类成分水溶性很差,在大生产过程中转移率偏低,本文采用先醇提后水煎煮的工艺路线,可最大化地保留桑叶中黄酮类组分群。桑叶吸水量较大,质地轻,水煎煮过程中会浮在液面上方,致使提取不充分,为保证有效成分的充分溶出并兼顾生产实际,提取过程中需加入大量水。

DNJ 是一类无紫外吸收的小分子生物碱,HPLC-UV 无法直接检测其含量^[9]。现在常采用蒸发光散射^[10]、质谱^[11]等检测手段。但蒸散的灵敏度较低、干扰较大,不利于工艺优选;质谱检测较为准确,但成本太高,故本文采用柱前衍生化 HPLC-UV 检测,选用衍生化试剂 FMOC-Cl 与 DNJ 反应,生成具有紫外吸收的 FMOC-DNJ。

DNJ 是一类多羟基哌啶生物碱^[12],热不稳定,高温会破坏其化学结构,降低桑叶药效,为了减少有效成分的损失并结合大生产实际,水煎煮过程中保持微沸即可,且在保证有效成分溶出的同时,宜尽可能地缩短加热时间。

[参考文献]

- [1] 郑红. 消渴病及其并病方药证治规律研究[D]. 济南: 山东中医药大学,2005.
- [2] 王尉. 桑叶中降血糖成分 1-脱氧野尻霉素及其类似物的研究[D]. 北京:北京工商大学,2010.
- [3] 陈雨微,徐茂义,赵丰权,等. 桑叶黄酮类化合物提取工艺及其降血糖作用研究进展[J]. 中华中医药学刊,2012,30(9):2084.
- [4] 兰才. 桑叶总黄酮提取工艺的优选研究[J]. 安徽农业科学,2013,41(3):1260.
- [5] 马静,万志平. 正交优化桑叶中 1-脱氧野尻霉素酸水提取的工艺[J]. 食品研究与开发,2010,31(10):36.
- [6] 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.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:279.
- [8] 欧阳臻,陈钧,李永辉. 柱前衍生化高效液相色谱荧光检测法测定桑叶中的 1-脱氧野尻霉素[J]. 分析化学研究简报,2005,33(6):817.
- [9] 刘金珠. 桑树乳汁中 DNJ 的含量测定及其对小鼠降血糖效果研究[D]. 合肥:安徽农业大学,2010.
- [10] 宋婕,邓洁丽,周光雄. HPLC-ELSD 法测定家桑野桑植株中 1-脱氧野尻霉素的含量[J]. 天热产物研究与开发,2011,23(3):490.
- [11] 戴开金,侯连兵,罗奇志. 高效液相色谱-串联四极杆质谱法测定桑叶中 1-脱氧野尻霉素[J]. 中药材,2009,32(3):375.
- [12] 姚瑜,徐立,谢文鑫,等. 桑树中 1-脱氧野尻霉素(DNJ)的研究进展[J]. 蚕学通讯,2007,27(2):35.

[责任编辑 刘德文]