

# 响应面分析法优化桑叶中1-脱氧野尻霉素的 稀酸乙醇浸提工艺

苏楠<sup>1,2</sup>, 何美霞<sup>1</sup>, 冯青<sup>1</sup>, 吴新荣<sup>1\*</sup>

(1. 广州军区广州总医院药学部, 广州 510010; 2. 广州中医药大学, 广州 510006)

**[摘要]** 目的: 优化桑叶中1-脱氧野尻霉素(1-DNJ)的稀酸乙醇浸提工艺。方法: 采用HPLC-ELSD测定1-DNJ含量, 流动相乙腈-水(90:10), ELSD漂移管温度40℃, 载气流速 $3.5 \times 10^5$  Pa。以1-DNJ提取率为指标, 在单因素试验基础上, 通过响应面分析法考察浸提时间、乙醇体积分数及pH对桑叶中1-DNJ提取工艺的影响, 利用Design Expert 7.1.6分析软件对试验数据进行分析。结果: 最佳工艺参数为乙醇体积分数66.53%, pH 6.66, 浸提时间2.73 h; 1-DNJ实际提取率0.1946%, 与理论量最优值0.1%相差较小。结论: 建立的二次多项数学模型准确可靠, 优选的提取工艺稳定可行, 为桑叶资源的开发利用提供参考。

**[关键词]** 1-脱氧野尻霉素; HPLC-ELSD; 响应面分析法; 稀酸稀醇溶媒浸提工艺; 桑叶

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)03-0013-04

**[doi]** 10.11653/syfj2014030013

## Optimization of Dilute Acid Ethanol Extraction Technology for 1-Deoxynojirimycin from Mori Folium by Response Surface Methodology

SU Nan<sup>1,2</sup>, HE Xian-xia<sup>1</sup>, FENG Qing<sup>1</sup>, WU Xin-rong<sup>1\*</sup>

(1. Department of Pharmacy, General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, China;

2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

**[Abstract]** **Objective:** To optimize dilute acid ethanol extraction technology of 1-deoxynojirimycin (1-DNJ) from Mori Folium. **Method:** HPLC-ELSD was adopted to determine the content of 1-DNJ with mobile phase of acetonitrile-water (90:10) and ELSD drift tube temperature of 40℃, flow rate of carrier gas was  $3.5 \times 10^5$  Pa. With yield of 1-DNJ as index, based on single factors, response surface methodology was adopted to investigate effects of soaking time, ethanol concentration and pH on extraction technology of 1-DNJ, then test data were analyzed by Design Expert 7.1.6 software. **Result:** Optimum process conditions of 1-DNJ were as follows: ethanol concentration 66.53%, pH value of 6.66, soaking time 2.73 h; Under these conditions, yield of 1-DNJ was 0.1946%, which had small difference between theoretical optimal value of 0.100%. **Conclusion:** This established quadratic multinomial model was accurate and reliable, optimized technology could provide a reference for development and utilization of Mori Folium resources.

**[Key words]** 1-deoxynojirimycin; HPLC-ELSD; response surface methodology; dilute acid ethanol extraction technology; Mori Folium

1-脱氧野尻霉素(1-DNJ)是一种多羟基哌啶类 小分子生物碱, 化学名3,4,5-三羟基-2-羟甲基四氢

**[收稿日期]** 20130708(019)

**[基金项目]** 广东省科技重点项目(2008A030201031)

**[第一作者]** 苏楠, 在读硕士, 从事中药新药研究, Tel:13416120553, E-mail:sunan5856@126.com

**[通讯作者]** \* 吴新荣, 主任药师, 博士生导师, 从事中药筛选及药理研究, Tel:020-36653476, E-mail:gzwrong@yahoo.com

吡啶,主要存在于桑树植物和微生物中。目前已从桑叶中分离出 6 种化合物,分别为 1-DNJ, *N*-甲基-1-DNJ (*N*-Me-DNJ), 2-*O*- $\alpha$ -*D*-半乳糖吡喃糖苷-1-DNJ (GAL-DNJ), 6-*O*- $\beta$ -*D*-吡喃葡萄糖基-1-脱氧野尻霉素 (6-*O*- $\beta$ -*D*-Glc-DNJ), 1,4 双脱氧-1,4-亚氨基-(2-*O*- $\beta$ -*D*-吡喃葡萄糖基)-*D*-阿拉伯糖醇 (2-*O*- $\beta$ -Glc-DAB) 及多羟基去甲莨菪碱 (Calystegine B<sub>2</sub>), 并确定了母核为 1-DNJ。研究证明生物碱类化合物及其衍生物具有治疗糖尿病、病毒性感染等许多疾病的作用<sup>[1]</sup>。

根据 1-DNJ 的分子结构特点,采用稀酸浸提法<sup>[2]</sup>具有条件温和、提取率高的优势;传统煎煮法则会使 1-DNJ 结构易被破坏,降低生物利用度;乙醇回流法的提取率优于煎煮法,但生产成本较高。本实验拟采用稀酸乙醇溶液浸提桑叶中 1-DNJ,以 1-DNJ 提取率为指标,在单因素试验基础上,采用响应面分析法优选提取工艺,为 1-DNJ 在医药和保健品方面的开发利用提供参考。

### 1 材料

1100 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司), JY5002 型电子天平(上海良平仪器仪表有限公司)。桑叶(购于广东和翔制药有限公司,经广东和翔制药有限公司质检部鉴定为桑科植物桑 *Morus alba* L. 的干燥叶), 1-脱氧野尻霉素(1-DNJ)对照品(Sigma-Aldrich 贸易公司,批号 LOT#051M0469V), 水为去离子水或超纯水,乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

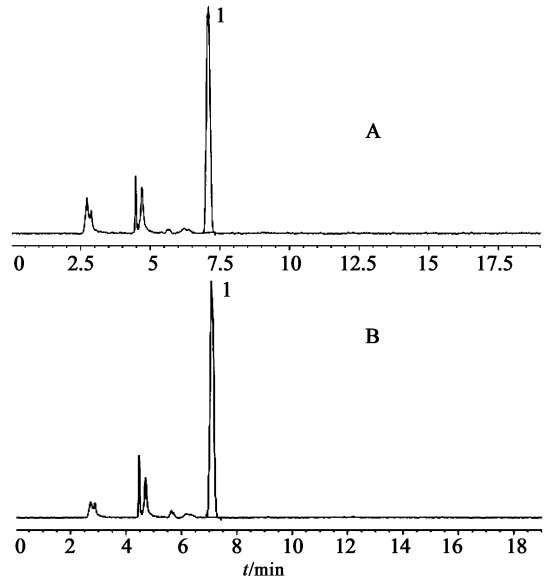
### 2 方法与结果

**2.1 树脂预处理** 根据 732H 型阳离子交换树脂生产厂家提供的预处理和再生方法,用水浸泡过夜,装入层析柱,用 5 倍量 4% 氢氧化钠冲洗树脂柱,使树脂转换为 Na<sup>+</sup> 型,加水洗至流出液近中性,加 5 倍量 5% 盐酸冲洗树脂柱,使树脂转化为 H<sup>+</sup> 型,用水洗至流出液 pH 6~7,备用。

**2.2 1-DNJ 提取液的制备** 精确称取桑叶 10.0 g,按一定比例加入乙醇、稀 HCl 等,置于 80 °C 恒温水浴浸提 2 次,抽滤,合并滤液并浓缩,于 5 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min,收集上清液,抽滤,定容至 10 mL。用 732H 型阳离子交换树脂富集纯化,除去中性及酸性成分,水洗至无色后用氨水-乙醇(70:30)混合液洗脱,收集洗脱液,减压浓缩除去氨水/乙醇,用水定容至 5 mL 量瓶中,精密量取 1 mL,加水定容至 25 mL 量瓶中,经 0.45  $\mu$ m 微孔滤膜滤过,备用,待 HPLC-ELSD 检测。

### 2.3 1-DNJ 的含量测定

**2.3.1 色谱条件** DIKMA Platisil NH<sub>2</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5  $\mu$ m), 流动相乙腈-水(90:10), 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, ELSD 漂移管温度 40 °C, 载气流速 3.5 × 10<sup>5</sup> Pa, 见图 1。



A. 对照品; B. 供试品; 1. 1-脱氧野尻霉素

图 1 桑叶提取液 HPLC-ELSD

**2.3.2 标准曲线的绘制** 精密称取 1-DNJ 对照品 3.56 mg 至 50 mL 量瓶中,加水制成 71.2 mg·L<sup>-1</sup> 的母液,分别取样 5, 10, 20, 30, 40  $\mu$ L, 按 2.3.1 项下色谱条件测定,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程  $Y = 624.56X - 112.74$  ( $R^2 = 0.9991$ ), 线性范围 0.356 ~ 2.848 mg·L<sup>-1</sup>。

**2.4 单因素试验考察** 固定其他提取条件,分别考察浸提时间、乙醇体积分数、料液比及 pH 对 1-DNJ 提取率的影响。浸提时间分别为 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 h, 结果发现 1-DNJ 提取率随浸提时间增加而逐渐增高,浸提 2.0 h 时 1-DNJ 提取率达最高值 0.167%, 之后随浸提时间的增加,1-DNJ 提取率减少,故选择浸提时间 2.0 h。乙醇体积分数分别为 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 显示 1-DNJ 提取率随乙醇体积分数增加而逐渐增高,体积分数为 60% 时逐渐平稳,于 70% 时达最高值 0.171%, 故乙醇体积分数为 65% ~ 70% 较适宜。pH 分别为 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 结果发现 1-DNJ 提取率随 pH 升高而逐渐增大,于 pH 6 时达最高值 0.160%, 之后 1-DNJ 提取率逐渐降低。料液比分别为 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30 倍,结果显示 1-DNJ 提取率随料液比升高而逐渐增高,于料液比为 1:25 时达最高值 0.160%。

**2.5 响应面分析试验**<sup>[2-11]</sup> 在单因素试验基础上,选取浸提时间、乙醇体积分数及 pH 为考察因素,固定料液比 1:25,以 1-DNJ 得率为响应值(试验点 1~17 中 3,5,6,7,11 为 0 点,其余均为析因点),根据 Box-Behnken 设计原则安排试验,因素水平见表 1,试验安排及结果见表 2。

**表 1 桑叶中 1-脱氧野尻霉素浸提工艺 Box-Behnken 试验因素水平**

水平编码	A 乙醇体积分数/%	B 浸提时间/h	C pH
-1	50	2.0	5
0	60	2.5	6
1	70	3.0	7

**表 2 桑叶中 1-脱氧野尻霉素浸提工艺 Box-Behnken 试验安排**

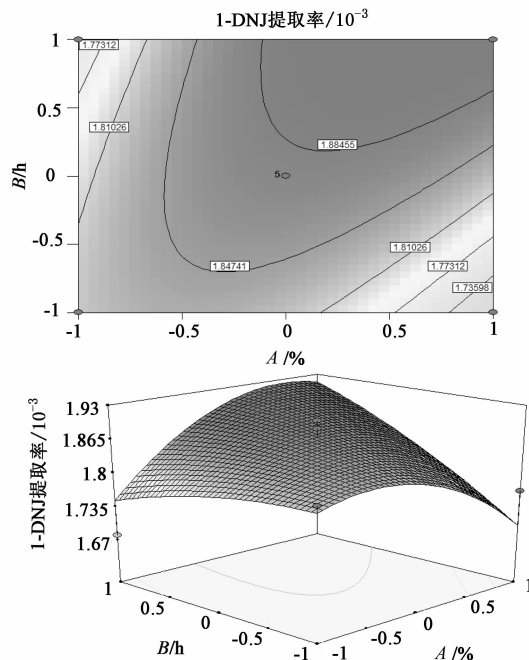
No.	A	B	C	1-DNJ 提取率/%
1	1	1	0	0.188 27
2	0	1	1	0.175 7 6
3	0	0	0	0.188 21
4	1	0	-1	0.200 37
5	0	0	0	0.183 91
6	0	0	0	0.188 29
7	0	0	0	0.188 44
8	1	0	1	0.186 37
9	-1	0	1	0.189 46
10	0	-1	-1	0.185 33
11	0	0	0	0.188 05
12	-1	0	-1	0.175 47
13	0	-1	1	0.193 58
14	1	-1	0	0.188 12
15	-1	1	0	0.171 44
16	-1	-1	0	0.183 37
17	0	1	-1	0.191 35

应用 Design Expert 7.1.6 软件对试验数据进行回归分析,得多元二次回归方程为  $Y = -0.258 + 0.027A + 0.482B + 0.637C + 6.040 \times 10^{-3} AB - 6.998 \times 10^{-3} AC - 0.119BC - 1.914 \times 10^{-4} A^2 - 0.133B^2 + 0.018C^2$ ,回归模型方差分析见表 3。

方差分析表明除  $C, A^2, C^2$  项无显著性影响外,其他项均对响应值具有极显著或显著性影响,缺拟项相对于纯差不显著,说明模式可靠,各因素对提取效果的影响顺序为  $A > B > C$ 。在回归方程基础上,应用 Design Expert 7.1.6 软件绘制响应面及等高线图,若等高线为椭圆则表明 2 个因素交互作用明显,若为圆形则表明交互作用不明显<sup>[12]</sup>,结果见图 2~4。

**表 3 回归模型方差分析**

方差来源	SS	<i>f</i>	MS	<i>F</i>	<i>P</i>
模型	0.076	9	$8.451 \times 10^{-3}$	16.91	0.000 6
A	0.024	1	0.024	47.08	0.000 2
B	$6.950 \times 10^{-3}$	1	$6.950 \times 10^{-3}$	13.91	0.007 4
C	$6.753 \times 10^{-4}$	1	$6.753 \times 10^{-4}$	1.35	0.283 2
AB	$3.648 \times 10^{-3}$	1	$3.648 \times 10^{-3}$	7.30	0.030 6
AC	0.020	1	0.020	39.19	0.000 4
BC	0.014	1	0.014	28.43	0.001 1
A <sup>2</sup>	$1.542 \times 10^{-3}$	1	$1.542 \times 10^{-3}$	3.09	0.122 4
B <sup>2</sup>	$4.659 \times 10^{-3}$	1	$4.659 \times 10^{-3}$	9.32	0.018 5
C <sup>2</sup>	$1.351 \times 10^{-3}$	1	$1.351 \times 10^{-3}$	2.70	0.144 2
缺拟项	$6.723 \times 10^{-4}$	3	$2.241 \times 10^{-4}$	0.32	0.813 7
纯差	$2.826 \times 10^{-3}$	4	$7.066 \times 10^{-4}$		
回归统计	0.080	16			



**图 2 乙醇体积分数及浸提时间对 1-DNJ 提取量的等高线和响应面 (pH 2)**

由图 2~4 可知,优选的桑叶中 1-DNJ 提取工艺参数为乙醇体积分数 66.53%, pH 6.66, 浸提时间 2.73 h;在该提取工艺条件下桑叶 1-DNJ 提取率预测值 0.1%。按最佳提取工艺进行 3 次验证试验,结果 1-DNJ 提取率 0.194 6%,与理论量相差较小,表明优选的工艺条件稳定可行。

### 3 讨论

1-DNJ 属于哌啶类小分子水溶性生物碱,现有文献多以去离子水、一定体积分数乙醇溶液及一定浓度酸溶液提取<sup>[8]</sup>,提取方法多选择传统煎煮法、

研究提供支持。

[参考文献]

[1] Watson A A, Fleet G W J, Asano N, et al. Polyhydroxylated alkaloids-natural occurrence and therapeutic applications [J]. *Phytochem*, 2001, 56 (3):265.

[2] 蒋运钢,贾俊强,桂仲争. 响应面分析法优化家蚕1-脱氧野尻霉素的稀酸浸提工艺[J]. *基因组学与应用生物学*, 2010, 29(4):703.

[3] 王丰俊,王运强,顾欣,等. 响应面法优化超声波提取构树叶中叶绿素的工艺研究[J]. *北京林业大学学报*, 2010, 32(6):135.

[4] 冯颖,陈巧红,孟宪军,等. 响应面法优化无梗五加果多糖超声波、微波法提取工艺研究[J]. *食品科学*, 2010, 31(22):268.

[5] Vichasilp C, Nakagawa K, Sookwong P, et al. Optimization of 1-deoxynojirimycin extraction from mulberry leaves by using response methodology [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2009, 73(12):2684.

[6] 汪志慧,孙智达,谢笔钧. 响应曲面法优化双酶法提取莲房原花青素[J]. *食品科学*, 2011, 32(4):64.

[7] 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.

[8] 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.

[9] 孟夏. 桑叶中1-脱氧野尻霉素的分离纯化技术研究[D]. 镇江:江苏大学, 2008.

[10] 王艳艳,王团结,丁琳琳. 响应面分析法优化葛根中异黄酮提取工艺[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(2):45.

[11] 徐蓉,陈钧,徐骅,等. 响应面法优化黄连黄柏中总生物碱的提取工艺[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2009, 15(9):26.

[12] Karuppaiya M, Sasikumar E, Viruthagiri T, et al. Optimization of process conditions using response surface methodology (RSM) for ethanol production from waste cashew apple juice by *Zymomonas mobilis* [J]. *Chem Eng Commun*, 2009, 196(11):1425.

[13] 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.

[责任编辑 全燕]

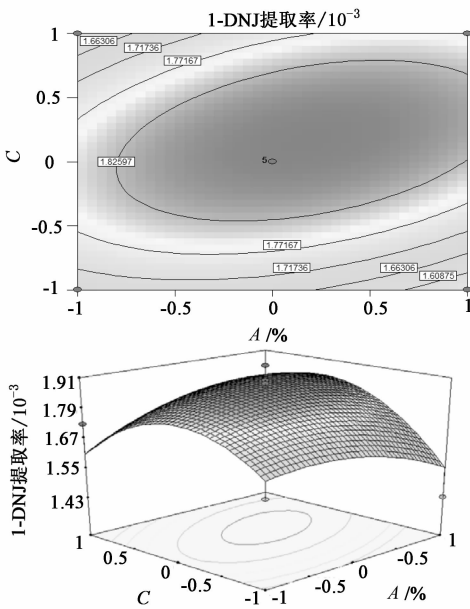


图3 乙醇体积分数及 pH 对 1-DNJ 提取量的等高线和响应面(浸提时间 2.5 h)

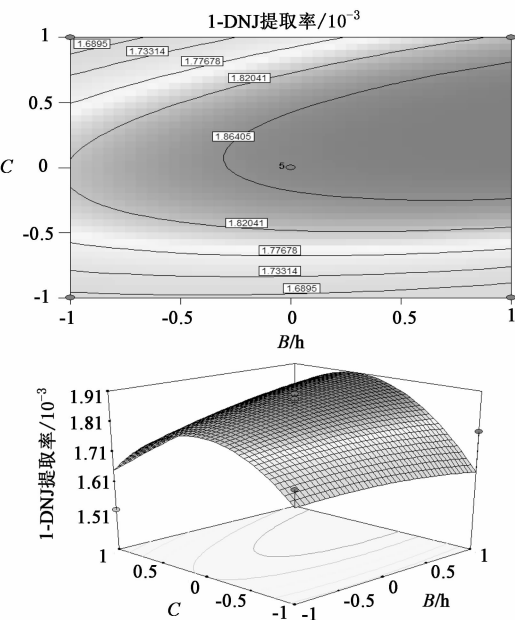


图4 浸提时间及 pH 对 1-DNJ 提取量的等高线和响应面(乙醇体积分数 60%)

回流提取法及超声波辅助提取法<sup>[8,13]</sup>等,本文选择稀酸乙醇溶液浸提法,并通过响应面分析法优选 1-DNJ 的提取工艺参数,具有提取率高和重复性优等特点,为桑叶 DNJ 富集纯化工艺研究及降糖机制