

桑叶中生物碱脱氧野尻霉素(DNJ)的最佳提取工艺探讨

蒋小飞^{1,2}, 赵忠启², 张宪党³

(1.重庆三峡学院 化学与环境工程, 重庆 万州 404000; 2.西南大学 药学院, 重庆 北碚 410076;

3.山东省医学科学院保健品研发中心, 山东 济南 250062)

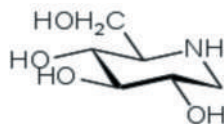
【摘要】采用正交试验, 考察PH值、料液比、提取时间三种因素对桑叶中生物碱脱氧野尻霉素(DNJ)提取工艺的影响, 通过高效液相衍生处理方法对含量进行检测, 得到最佳的提取工艺为: 提取液的酸度为0.2%, 料液比1:5, 提取时间1.5小时。

【关键词】桑叶; DNJ; 正交实验; 提取工艺

【中图分类号】TQ464.4 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1673-1891(2010)04-0050-03

桑叶史载于《神农本草经》, 味苦, 甘, 性寒。归肺, 肝经。具有疏风清热, 平肝明目的作用。历代医药书籍中记载治疗消渴症, 现在研究中常用作糖尿病的治疗, 具有极高的药学价值^[1]。生物碱1-脱氧野尻霉素(DNJ)是桑叶中主要的有效成分之一。现代药理实验证明DNJ具有降血糖, 抗菌消炎等作用, 在食品和药品上的应用前景广阔^[2]。本文就桑叶生物碱的提取和含量测定进行了研究, 为合理开发桑叶资源提供依据。

DNJ中不含有苯环, 双键, 羰基等发色基团, 因此不能用常规方法进行检测, 据文献报道对桑叶生物碱可采用高效液相柱前衍生荧光检测方法和高效液相蒸发光散射检测法。^[2]本实验采用柱前衍生荧光检测方法。



1-脱氧野尻霉素(DNJ)

1 材料和方法

1.1 材料

桑叶购于北碚桐君阁大药店, 在真空干燥箱中60℃干燥至恒重, 粉碎备用。甲醇、硫酸、磷酸盐均为分析纯; 乙腈、醋酸为色谱纯。DNJ标准品购于上海融禾试剂有限公司。水为一级水。

1.2 仪器

HPLC为日本岛津, SHB—III循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司); BS220ZS分析天平(0.000)(北京赛多利斯仪器系统有限公司); RE—52AA型旋转蒸发器(上海亚荣生活仪器厂)。

1.3 测定方法

1.3.1 色谱条件

色谱柱为Hypersil C18色谱柱, 流动相为乙腈—水—醋酸(50:50:1), 体积流量1mL/min, 柱温25℃,

检测器温度35℃, 进样量20μL。

1.3.2 标准溶液的配制

准确称取DNJ 5.00mg, 用蒸馏水溶解, 并定容10mL于4℃条件下避光保存, 使用前用流动相稀释, 配制成不同浓度的对照品溶液。

1.3.3 DNJ对照品的衍生化处理

取上述提取液10μL于1mL的离心管中, 加10μL硼酸盐缓冲液(pH8.5), 再加入20μL, 10 mmol/L FMO-C L的乙腈溶液, 混匀后于20℃水浴反应20 min, 之后加入10μL 0.2 mol/L的甘氨酸, 让剩余的衍生化试剂反应, 最后加入950 μL(V/V)的醋酸水溶液, 混匀后用0.45 μL的一次性针头过滤器过滤后, 取20μL进样分析。

1.3.4 标准曲线的绘制

分别吸取DNJ标准溶液适量, 加流动相稀释成20, 40, 60, 80, 100μL/mL溶液, 经过衍生处理后过0.45μm的微孔滤膜过滤, 备用。吸取20μL衍生处理后的DNJ标准液进行高效液相检测, 以峰面积为纵坐标, 质量浓度为横坐标绘制标准曲线, 得线性方程, 取DNJ对照品液, 分别配制成浓度为0.5, 1, 5, 10, 15, 20μg/μL的样品进行检测, 以峰面积(Y)对质量浓度(X)进行线性回归, 得到回归方程为Y=79.372X+639 R=0.9991, 显示线性关系良好。结果表明线性关系良好, 最低检测浓度为0.1mg/mL。

1.3.5 样品液的制备和含量的测定

精密称取10.0g已干燥至恒重的桑叶样品, 按单因素实验和正交试验的不同条件进行回流提取, 提取液经过过滤后减压浓缩, 用蒸馏水定容200mL, 然后用微孔滤膜过滤, 取20μL, 在HPLC中按照“2.1.4”方法进行检测, 由回归方程计算出DNJ的含量。

2 结果与分析

2.1 单因素实验

2.1.1 不同酸度的溶剂对DNJ提取率的影响

收稿日期: 2010-09-25

作者简介: 蒋小飞(1973—), 男, 云南蒙自人, 讲师, 在读博士研究生, 研究方向: 天然产物提取分离及结构修饰。

出于节约成本的角度考虑本实验用酸水浸提,称取桑叶粉末4份,每份10g,分别用水,0.3%酸水(硫酸),0.5%酸水,1%酸水作为溶剂。按照料液比1:10进行浸提,提取次数3次,提取时间2小时。提取温度60℃,然后将1,2,3次提取液合并,离心,去上清液。样品处理,液相检测。结果见图1,X轴,1为纯水。2为0.3%酸水。3为0.5%酸水。4为1%酸水。结果表明在0.3%附近的提取率最高,因此在正交试验中笔者以0.3%为中间水平,分别设置0.2%,0.3%,0.4%三个水平。

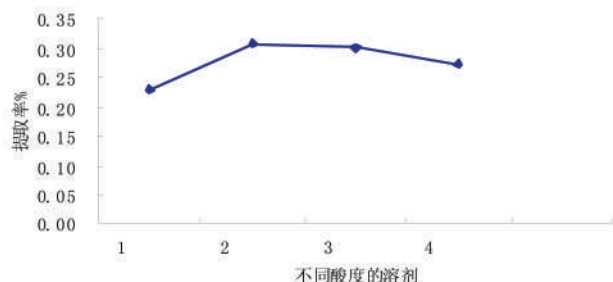


图1 不同酸度的溶剂对DNJ提取率的影响

2.1.2 不同料液比对DNJ提取率的影响

称取桑叶粉末4份,每份10g,提取液的酸度为0.3%硫酸,提取次数3次,提取时间2个小时。提取温度60℃。料液比分别为1:4、1:6、1:8、1:10,提取完成后按照同样操作进行液相分析,得图2。结果表明在料液比为1:6以后上升缓慢,考虑到后续处理工艺成本因素,笔者以1:6为中间水平,取1:5,1:6,1:7三个水平。

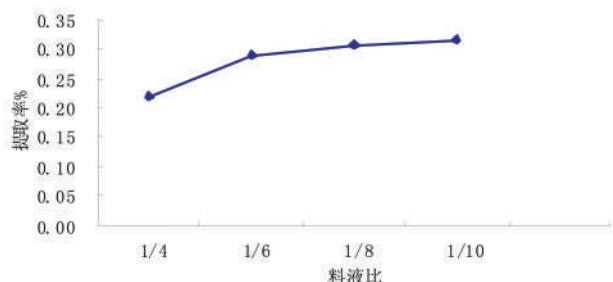


图2 不同料液比对DNJ提取率的影响

2.1.3 提取时间对DNJ提取率的影响

称取桑叶粉末4份,每份10g,提取液的酸度为

0.3%硫酸,提取次数3次,提取时间2小时。提取温度60℃。料液比为1:6。提取时间分别为40min,80min,120min,160min。提取完成后按照同样操作进行液相分析,得图3。结果表明在提取时间为120min处提取率最高,所以笔者选120min为水平,

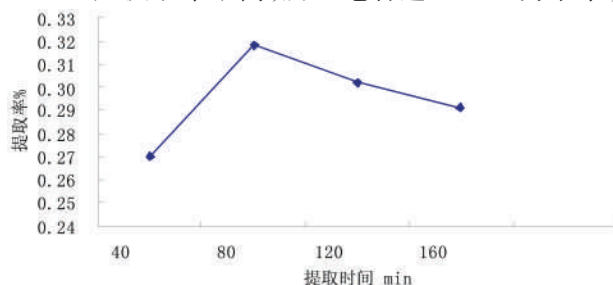


图3 不同提取时间对DNJ提取率的影响

2.1.4 提取次数对DNJ提取率的影响

称取桑叶粉末4份,每份10g,提取液的酸度为0.3%硫酸,提取时间2小时。提取温度60℃,料液比1:6,提取4次,分别过滤,取上清液,分别进行液相检测,计算提取液中DNJ的浓度,图4结果表明在提取第四次时和第三次提取率差距较多,考虑到工艺

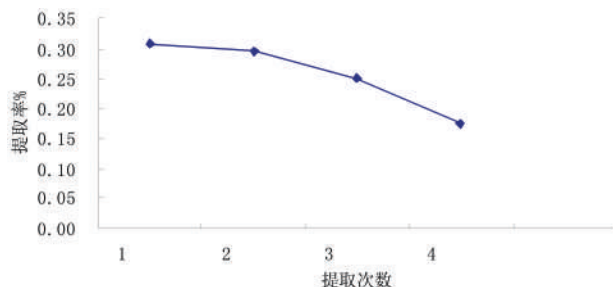


图4 不同提取次数对DNJ提取率的影响

2.2 正交试验

为优选出最佳提取工艺,结合以上单因素试验,设计正交试验表以DNJ的提取率为考察指标。在桑枝皮的提取条件中,通过柱前衍生法测定提取物中DNJ的含量来考察(硫酸液酸度)、料液比、提取时间和提取次数对桑枝皮中活性成分提取的影响,设2次重复,采用 $L_9(3^4)$ 四因素三水平,正交实验见表1和表2。

表1 因素和水平

水平	因素			
	A 酸度	B 料液比	C 浸提时间(min)	D 提取次数
1	0.2%	1:5	100min	1
2	0.3%	1:6	120min	2
3	0.4%	1:7	140min	3

表2 正交实验设计

因素	酸度	料液比	时间	次数	实验结果
试验1	1	1	1	1	39.0%
试验2	1	2	2	2	44.21%
试验3	1	3	3	3	45.4%
试验4	2	1	2	3	79.8%
试验5	2	2	3	1	79.0%
试验6	2	3	1	2	78.8%
试验7	3	1	3	2	43.8%
试验8	3	2	1	3	0.255%
试验9	3	3	2	1	41.4%
均值1	44.6%	54.2%	56.2%	43.2%	
均值2	79.2%	58.0%	55.2%	55.6%	
均值3	43.4%	49.8%	59.8%	60.4%	

表3 SPSS软件方差分析结果

因素	偏差平方和	自由度	F比	显著性
酸度	0.059	2	3.806	有影响
料液比	0.001	2	0.065	
时间	0	2	0.000	
次数	0.002	2	0.129	
误差	0.06	8		

3 结论

因素的重要性是A>D>B>C,提取中的酸度和提取次数有差异,提取时间和料液比差异不显著,从成本考虑最优方案应该是A₂B₃C₁D₃,即提取酸度为0.3%的酸水,料液比为1:7,提取时间为100min,提

取次数为3次。验证试验:精确称取三份桑枝皮粉末,各10g,提取液的酸度为0.3%,料液比为1:7,提取时间为100min,提取次数为3次。离心出去杂质,上清液合并,进行DNJ测定,证明A₂B₃C₁D₃为最优工艺。

注释及参考文献:

- [1]张明发,沈雅琴,朱自平,等.辛温(热)合归脾胃经中药药性研究(Ⅳ)镇痛作用[J].中药药理与临床,1996,12(4):1.
- [2]顾冠.云桑的化学成分和生活活性研究进展[J].国外医药(植物药分册),2007,22(1):21-23.
- [3]耿鹏,朱元元.桑树资源中1-脱氧野尻霉素的测定及其生物活性分析[J].中草药,2005,36(8):34-37.

Research on Extraction Process of Alkaloidt(DNJ)in Mulberry Leaf

JIANG Xiao-fei^{1,2}, ZHAO Zhong-qi², ZHANG Xian-dang³

(1.College of Chemical and Environmental Engineering, Chongqing Three Gorges University, Wanzhou, Chongqing 404000; 2.School of Pharmaceutical Science, Sowthwest University, Beipei, Chongqing 410076; 3.Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan, Shandong 250062)

Abstract: Using orthogonal test method, this paper studies the influnce that the pH rate, the liquor ratio and extraction time have on the DNJ extraction technology in mulberry leaves. Testing the content by High Performance Liquid Chromatography, the best extraction condition is determined. That is: acidity 0.2% , powder/solvent=1: 5, 1.5hours.

Key words: Mulberry leaf; DNJ; Extraction process orthogonal experiment; Extracting process