

桑白皮有效成分分离纯化的工艺研究^Δ

董德刚^{1*}, 张秀英², 刘小雪²(1.大连医科大学第二附属医院, 辽宁大连 116027; 2.辽宁中医药大学研究生学院, 沈阳 110847)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)28-3960-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.28.24

摘要 目的:优化桑白皮有效成分的分离纯化工艺。方法:用大孔树脂静、动态吸附解吸法,以吸附率、解吸率等为指标,优选总黄酮分离纯化工艺中大孔树脂类型、上样液量、洗脱剂体积分数、洗脱剂用量;采用水提醇沉法,以多糖得率和纯度为指标,优选总多糖分离纯化工艺中沉淀多糖所用乙醇体积分数;用离子交换法,以总生物碱吸光度为指标,优选总生物碱分离纯化工艺中上样液量、洗脱剂用量;并进行验证试验。结果:桑白皮总黄酮最优工艺为D101大孔树脂为吸附剂,上样液质量浓度为0.1 g(生药)/ml,上样液量为9倍柱体积(BV),用5 BV 70%的乙醇洗脱;总多糖最优工艺中沉淀多糖的乙醇体积分数为80%;总生物碱最优工艺为上样液量3 BV,用8 BV 0.5 mol/L的氨水洗脱。分离纯化后桑白皮总黄酮、总多糖、总生物碱平均纯度分别为35.68%、47.14%、55.79%,RSD分别为1.28%、1.61%、1.14%(n=3)。结论:优选的工艺条件稳定,适合桑白皮有效成分的分离纯化。

关键词 桑白皮;总黄酮;总多糖;总生物碱;分离;纯化

Technology Study of Separation and Purification of Active Constituents from *Morus alba* L.

DONG De-gang¹, ZHANG Xiu-ying², LIU Xiao-xue²(1.The Second Hospital of Dalian Medical University, Liaoning Dalian 116027, China; 2.Graduate School, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the technology of separation and purification of active constituents from *Morus alba* L. METHODS: With the adsorption rate and desorption rate as the indexes, static and dynamic macroporous resin adsorption-desorption methods were adopted to optimize the type of macroporous resin, the loading amount of fluid, the volume fraction and amount of eluent in the separation and purification technology of total flavonoids. With the yield and content of polysaccharide as the indexes, water extraction and alcohol precipitation method was used to optimize the volume fraction of alcohol for polysaccharide precipitation in the separation and purification technology of total polysaccharides. With the absorbance of total alkaloids as the index, ion exchange method was employed to optimize the loading amount of fluid and the amount of eluent in the separation and purification technology of total alkaloids. Then the verification was conducted. RESULTS: The optimal technology of total flavonoids from *Morus alba* L. was with D101 macroporous resin as the adsorbent, loading fluid mass concentration of 0.1 g (material medicinal)/ml, loading fluid amount 9 times as the column volume (BV), 70% alcohol of 5 BV for elution. The optimal volume fraction of alcohol for polysaccharide precipitation in the technology of total polysaccharides was 80%. The optimal technology of total alkaloids was with loading fluid amount of 3 BV, 0.5 mol/L ammonia water of 8 BV for elution. After separation and purification, the purities of total flavonoids, total polysaccharides and total alkaloids from *Morus alba* L. were 35.68%, 47.14% and 55.79%, and the RSDs were 1.28%, 1.61% and 1.14% (n=3). CONCLUSIONS: The optimal technology is stable and suitable for the separation and purification of active constituents from *M. alba* L.

KEYWORDS *Morus alba* L.; Total flavonoids; Total polysaccharides; Total alkaloids; Separation; Purification

- [J].上海应用技术学院学报:自然科学版,2014,14(2):113.
- [3] 顾金霞,袁汝华.模糊综合评价模型在水资源费测算中的应用[J].南水北调与水利科技,2014,12(4):177.
- [4] 侯风波.高等数学[M].北京:高等教育出版社,2004:215.
- [5] 付晓萍,李凌飞,周玮,等.模糊数学评判桑叶挂面的生产配方[J].食品科技,2013,38(12):180.
- [6] 刘瑞江,张业旺,闻崇炜,等.正交试验设计和分析方法研究[J].实验技术与管理,2010,27(9):52.
- [7] 国家食品药品监督管理总局.YBH01472014 复方氨酚那敏颗粒[S].2014-04-30.
- [8] 姬长英.感官模糊综合评价中权重分配的正确制定[J].食品科学,1991(3):11.
- [9] 邱鸿钟,王晓曼,梁瑞琼,等.优化基本药物遴选模型和方法的建议[J].中国药房,2014,25(24):2209.
- [10] 肖玫,刘彪,毛建虹.腌制美味泡嫩姜的最佳配方与生产工艺研究[J].江苏农业科学,2010(2):286.
- [11] 侯娟,王静,张妮妮,等.瑞舒伐他汀钙口腔崩解片的制备工艺优化[J].中国药房,2013,24(45):4270.
- Δ 基金项目:辽宁省科技厅科学技术计划项目(No.2013225002)
* 主任医师,博士。研究方向:中医药防治病理性疾病。电话:0411-84671291。E-mail:731939056@qq.com
- (收稿日期:2015-05-28 修回日期:2015-08-06)
(编辑:刘萍)

桑白皮为桑科落叶灌木或小乔木植物桑 *Morus alba* L. 的干燥根皮, 含有黄酮类、生物碱类、多糖类等多种物质, 具有泻肺平喘、利水消肿的功效^[1]。药理研究显示, 桑白皮总黄酮具有降低血糖血脂^[2]、抗病毒^[3]等作用; 桑白皮提取物(桑黄酮含量 > 30%) 对实验性糖尿病模型大鼠坐骨神经损伤有一定的改善作用^[4]; 桑白皮多糖对四氯化碳、对乙酰氨基酚所致小鼠急性肝损伤均有明显的保护作用^[5]; 且桑白皮总黄酮、总多糖及总生物碱各部位均具有一定的降糖作用^[6]。笔者拟根据桑白皮总黄酮、总多糖、总生物碱不同有效成分的性质, 优选桑白皮有效部位的分离纯化工艺, 为有效提取桑白皮有效成分提供参考。

1 材料

1.1 仪器

HH-S 恒温水浴锅(金坛市亿通电子有限公司); KYC-1102 恒温摇床(上海福玛实验设备有限公司); UV-1750 紫外分光光度计(日本岛津公司)。

1.2 药品与试剂

芦丁对照品(四川省维克奇生物科技有限公司, 批号: 130824, 纯度: $\geq 98\%$); 葡萄糖对照品(四川省维克奇生物科技有限公司, 批号: 130407, 纯度: $\geq 98\%$); 4-羟基哌啶(阿拉丁试剂有限公司, 批号: 41944, 纯度: 98%); D101 大孔吸附树脂、HPD400 大孔吸附树脂、AB-8 大孔吸附树脂、001 \times 7 阳离子交换树脂均购自沧州宝恩吸附材料科技有限公司; 桑白皮饮片(辽宁中医药大学附属第一医院, 批号: 20140110); 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 总多糖、总黄酮、总生物碱的含量测定

2.1.1 总多糖含量测定 采用苯酚-硫酸法^[7]。称取葡萄糖对照品 6.19 mg, 置于 50 ml 量瓶中, 加蒸馏水溶解并稀释至刻度, 超声振荡得 0.123 8 mg/ml 的葡萄糖对照品贮备液。分别量取上述贮备液 0、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8 ml 于具塞试管中, 用蒸馏水定容至 2.0 ml, 再加入 1.0 ml 6% 苯酚溶液及 5.0 ml 98% 浓硫酸, 盖塞, 静置 10 min, 摇匀, 再放置 20 min, 用分光光度计于 490 nm 波长处测定吸光度(A)。以质量浓度(c) 为横坐标、 A 为纵坐标进行线性回归, 得回归方程为 $A = 7.828 3c - 0.025 3$ ($r = 0.999 1$)。结果显示, 葡萄糖检测质量浓度线性范围为 0.024 8~0.111 4 mg/ml。

2.1.2 总黄酮含量测定 采用硝酸铝-亚硝酸钠比色法^[8]。精密称取芦丁对照品 5.690 1 mg 于 50 ml 量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 即得芦丁对照品溶液。准确吸取 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 ml 芦丁对照品溶液于 10 ml 量瓶中, 分别加乙醇至 5 ml, 然后加入 0.05 g/ml 亚硝酸钠溶液 0.3 ml, 摇匀, 静置 6 min; 加入 0.1 g/ml 硝酸铝溶液 0.3 ml, 摇匀, 静置 6 min; 加入 1 mol/L 氢氧化钠溶液 4 ml, 再加无水乙醇至 10 ml, 摇匀, 静置 15 min。用分光光度计于 498 nm 波长处测定 A , 以 c 为横坐标、 A 为纵坐标进行线性回归, 得回归方程为 $A = 6.545 6c + 0.124 8$ ($r = 0.998 4$)。结果显示, 芦丁检测质量浓度线性范围为 0.011 4~0.091 1 mg/ml。

2.1.3 总生物碱含量测定 采用雷氏盐比色法^[9]。精密称取

4-羟基哌啶 0.307 8 g, 置于 50 ml 量瓶中, 用 0.05 mol/L 盐酸溶液稀释至刻度, 得 6.156 mg/ml 4-羟基哌啶对照品溶液。取 0、0.2、0.4、0.8、1.0、1.2、1.6、2.0 ml 4-羟基哌啶对照品溶液于具塞试管中, 加入 0.05 mol/L HCl 溶液至 2 ml, 再加入 20 g/L 的雷氏盐溶液 3 ml, 摇匀, 冰浴 1 h, 以离心半径为 15 cm(下同)、3 500 r/min 离心 10 min。取沉淀, 用水洗涤至洗涤液无色, 用 70% 丙酮溶液溶解沉淀, 以 3 500 r/min 离心 5 min。用分光光度计于 498 nm 波长处测定 A , 以 c 为横坐标、 A 为纵坐标进行线性回归, 得回归方程为 $A = 0.259 4c - 0.137 8$ ($r = 0.999 4$)。结果显示, 4-羟基哌啶检测质量浓度线性范围为 0.615 6~6.156 0 mg/ml。

2.2 桑白皮提取物的制备

根据文献[10-12], 取干燥桑白皮粉碎, 称取 100 g 加入 8 倍量 80% (g/ml) 乙醇浸泡, 回流提取 2 次, 每次 2 h。收集提取液, 蒸发浓缩, 并加一定量蒸馏水稀释提取液至质量浓度为 0.1 g(生药)/ml, 此提取液作为总黄酮、总生物碱提取液。药渣加 8 倍量蒸馏水回流提取 2 次, 每次 2 h, 合并水提取液, 减压浓缩, 此浓缩液作为总多糖提取液。

2.3 含量测定方法学考察

2.3.1 精密度试验 取葡萄糖对照品溶液 1.0 ml、芦丁对照品溶液 2.0 ml、4-羟基哌啶对照品溶液 1.0 ml, 分别测定 A , 平行测定 5 次。结果, 葡萄糖、芦丁、4-羟基哌啶 A 的 RSD 分别为 0.55%、0.37%、0.59% ($n = 5$), 表明仪器精密度良好。

2.3.2 稳定性试验 分别吸取桑白皮总多糖、总黄酮、总生物碱提取液适量, 在 30 min 内, 每隔 5 min 测定 1 次 A , 一共测定 6 次。结果, 总多糖、总黄酮、总生物碱 A 的 RSD 分别为 1.36%、1.11%、1.98% ($n = 6$), 表明各供试品溶液在 30 min 内基本稳定。

2.3.3 重复性试验 分别吸取桑白皮总多糖、总黄酮、总生物碱提取液适量, 各 5 份, 分别测定其 A 。结果, 总多糖、总黄酮、总生物碱 A 的 RSD 分别为 1.29%、1.46%、1.81% ($n = 5$), 表明本方法重复性良好。

2.3.4 加样回收率试验 分别吸取已知含量的桑白皮总多糖、总黄酮、总生物碱提取液适量, 各 5 份, 分别加入一定量的相应对照品溶液, 测定其 A , 计算平均回收率。结果, 总多糖、总黄酮、总生物碱 A 的平均加样回收率分别为 100.79%、101.45%、101.23%, RSD 分别为 1.21%、2.18%、1.48% ($n = 5$)。

2.4 总黄酮的分离纯化

2.4.1 大孔吸附树脂的筛选 将已处理好的 D101、AB-8、HPD400 大孔吸附树脂中游离水分抽干, 称取 1 g, 置于 50 ml 锥形瓶中, 加入总黄酮提取液 20 ml, 25 $^{\circ}$ C 恒温振荡 24 h, 振荡速度为 130 r/min, 使其充分吸附, 抽滤, 测定滤液 A , 计算总黄酮吸附率[吸附率 = (吸附量 - 初始量) / 初始量 \times 100%]。将树脂抽滤至干, 各加入 95% 乙醇 20 ml, 按前述振荡条件振荡 24 h, 使其充分解吸附, 抽滤, 测定滤液 A , 并计算总黄酮的静态解吸率(解吸率 = 解吸量 / 吸附量 \times 100%)。结果, D101、HPD400 和 AB-8 大孔对树脂桑白皮黄酮的吸附率分别为 78.32%、79.27%、76.49%, 解吸率分别为 70.12%、68.34%、62.79%。这表明 D101 大孔吸附树脂对桑白皮总黄酮的静态吸附性能和

静态解吸性能均较好,所以进一步研究其对桑白皮总黄酮的动态吸附。

2.4.2 上样液量的筛选 量取D101大孔吸附树脂10 ml,湿法装柱,加入桑白皮总黄酮提取液,进行动态吸附的流速为1.0 ml/min,流出液每1 BV(柱体积倍数)收集1管并测定流出液中桑白皮总黄酮的A,绘制动态吸附曲线,见图1。

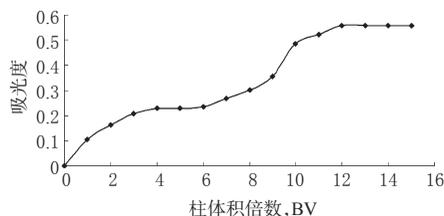


图1 不同上样液量对桑白皮总黄酮吸光度的影响

Fig 1 Effects of different loading amounts of fluid on the absorbance of total flavonoids from *M. alba* L.

由图1可知,D101大孔吸附树脂对桑白皮总黄酮动态吸附过程中,流出液的总黄酮浓度逐渐升高(A增大);当上样液量为9 BV时,流出液总黄酮的浓度接近于桑白皮总黄酮原液浓度(流出液的A接近原液),达到了吸附平衡。因此,确定上样液的最佳上样液量为9 BV。

2.4.3 洗脱剂体积分数的筛选 准确吸取上样液,平行4份,以1.0 ml/min上柱,至吸附完全后,用水洗脱至无色,然后分别用30%、50%、70%、90%乙醇各40 ml洗脱,收集洗脱液,测定洗脱液A,计算树脂解吸量(解吸量=洗脱液浓度×洗脱液体积)和总黄酮解吸率(解吸率=解吸量/吸附量×100%)。结果表明,D101大孔吸附树脂对桑白皮总黄酮解吸率随乙醇体积分数的增大呈先增大后减小的变化趋势,可能是由于乙醇体积分数增大,醇溶性的杂质增多,降低了解吸率。因此,确定以70%乙醇溶液进行洗脱,结果见表1。

表1 不同乙醇体积分数对桑白皮总黄酮的洗脱影响

Tab 1 Effects of different volume fractions of alcohol on the elution of total flavonoids from *M. alba* L.

乙醇体积分数, %	解吸量, mg	解吸率, %
30	24.706 0	34.94
50	35.272 9	49.88
70	46.393 3	65.60
90	38.716 5	54.75

2.4.4 洗脱剂用量的筛选 准确量取已处理好的D101大孔吸附树脂10 ml,准确吸取90 ml上样液,以1.0 ml/min上柱,至吸附完全后,先用水洗脱,再用70%乙醇以1.0 ml/min洗脱。流出液每1 BV收集1管,至流出液基本无黄酮时(测定流出液吸光度值很低,当7 BV时A=0.127 8)停止。测定各流出液中桑白皮总黄酮的A,绘制桑白皮总黄酮的洗脱曲线,见图2。

从图2可知,D101大孔吸附树脂在对桑白皮总黄酮的动态洗脱过程中,2 BV的70%乙醇对桑白皮总黄酮的洗脱效率最高,但5 BV左右的乙醇可以将其洗脱完全。因此,确定洗脱剂用量为5 BV。

2.4.5 总黄酮的提取 综上所述,确定了D101大孔吸附树脂纯化桑白皮总黄酮的最佳工艺为:上样液质量浓度为0.1 g(生

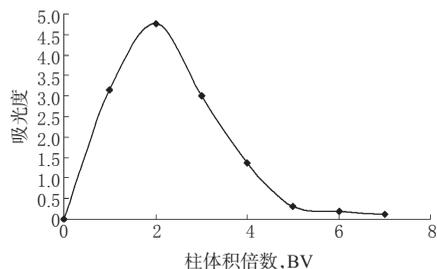


图2 不同洗脱剂用量对桑白皮总黄酮吸光度的影响

Fig 2 Effects of different amounts of eluent on the absorbance of total flavonoids from *M. alba* L.

药)/ml,最大上样量9 BV,洗脱剂为70%的乙醇,洗脱剂用量为5 BV,减压干燥乙醇洗脱液。按上述工艺条件操作后制得桑白皮总黄酮。

2.5 总多糖的分离纯化

将桑白皮总多糖提取液分成3等份,分别加入95%乙醇,使其含醇体积分数至60%、70%、80%,静置12 h,抽滤得总多糖沉淀。沉淀先后用无水乙醇、丙酮多次洗涤,干燥称质量,计算总多糖得率;测定总多糖含量并计算总多糖纯度。结果,3种乙醇体积分数下总多糖得率分别为1.7%、1.9%、2.5%,总多糖纯度分别为40.22%、44.53%、47.15%。因此,确定沉淀多糖的最佳乙醇体积分数为80%。

2.6 总生物碱的分离纯化

向总生物碱提取液中加入2 mol/L盐酸,调节pH为2~4,抽滤,去除滤渣,将总生物碱滤液作为上柱样品溶液。

2.6.1 上样液量的筛选 量取预处理好的001×7阳离子交换树脂20 ml装柱,将总生物碱滤液加入到离子交换柱中,流速2 ml/min,每1 BV收集1管,测定各流出液中桑白皮总生物碱A,绘制动态吸附曲线,见图3。

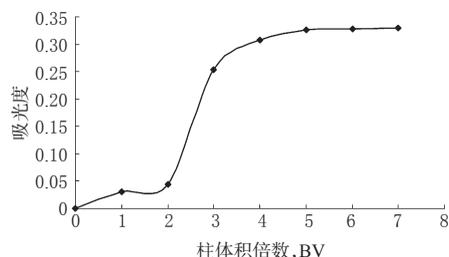


图3 不同上样液量对桑白皮总生物碱吸光度的影响

Fig 3 Effects of different loading amounts of fluid on the absorbance of total alkaloids from *M. alba* L.

由图3可知,流出液中桑白皮总生物碱的A至上样液量为3 BV时趋于平缓,即上样3 BV时已达到001×7阳离子交换树脂对桑白皮总生物碱的最大吸附量。因此,确定最佳上样液量为3 BV。

2.6.2 洗脱剂用量的筛选 准确量取桑白皮总生物碱提取液3 BV,通过已处理好的001×7阳离子交换树脂柱,然后用去离子水洗至流出液为无色,再以0.5 mol/L氨水洗脱,每1 BV收集1管,测定各流出液中桑白皮总生物碱的A,绘制洗脱曲线,见图4。

由图4可知,洗脱剂用量为3 BV时流出液中桑白皮总生

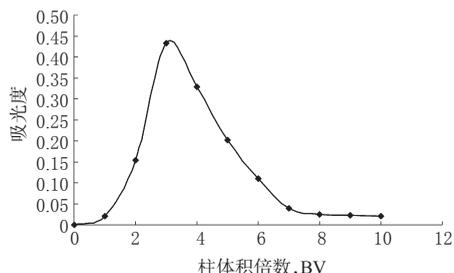


图4 不同洗脱剂用量对桑白皮总生物碱吸光度的影响

Fig 4 Effects of different amounts of eluent on the absorbance of total alkaloids from *M. alba* L.

物碱浓度最高(4最大),至8 BV时洗脱完全。因此,确定将桑白皮总生物碱洗脱完全需要0.5 mol/L氨水8 BV。

2.6.3 总生物碱的提取 将收集的氨水洗脱液减压浓缩,浓缩液中按1:1比例加入正丁醇,振摇提取5次,合并正丁醇液。综上所述,桑白皮总生物碱提取液以001×7阳离子交换树脂为吸附剂,上样3 BV后用0.5 mol/L氨水8 BV洗脱,将氨水洗脱液浓缩并用正丁醇萃取[浓缩液-正丁醇(1:1, V/V)],合并正丁醇液,减压浓缩,干燥,得桑白皮总生物碱。

2.7 验证试验

根据“2.4”“2.5”“2.6”项下所述的桑白皮总黄酮、总多糖、总生物碱的纯化工艺,各进行3次验证试验。结果,桑白皮总黄酮干燥粉末的纯度分别为35.67%、35.22%、36.14%,平均纯度为35.68%,RSD为1.28%(n=3);桑白皮总多糖干燥粉末的纯度分别为47.99%、46.51%、46.93%,平均纯度为47.14%,RSD为1.61%(n=3);桑白皮总生物碱干燥粉末的纯度分别为55.74%、56.45%、55.18%,平均纯度为55.79%,RSD为1.14%(n=3)。结果表明上述纯化工艺稳定、可靠。

3 讨论

本研究通过D101大孔树脂吸附、分离纯化桑白皮总黄酮,通过水提醇沉的方法分离纯化桑白皮总多糖,通过001×7阳离子交换树脂吸附与正丁醇萃取分离纯化桑白皮总生物碱,其干燥后总多糖、总黄酮、总生物碱粉末平均纯度分别为47.14%、35.68%、55.79%。笔者通过不同的分离纯化方法,分别制得桑白皮3种不同有效成分,对于桑白皮的工业开发利用与药理药效的研究有一定意义。

水提醇沉是提取中药中总多糖成分的一种经典工艺,具有方便、快捷、简单的特点,本试验方法可作为桑白皮总多糖的富集工艺。

针对总生物碱的性质选用强酸性阳离子交换树脂,将酸化的总生物碱提取液通过树脂,使总生物碱盐的阳离子交换到树脂上而与其他成分和杂质分离;再用氨水碱化得到游离态总生物碱,并经正丁醇萃取,萃取前后的纯度分别为28%(未经萃取的生物碱溶液干燥后所得)、55%。因此,桑白皮总

生物碱的提取纯化工艺虽较复杂,但有效地增加了桑白皮总生物碱的纯度。

桑白皮总黄酮的纯度还有待提高,分析其原因如下:其一,可能是不同产地、不同采集时间及不同贮藏时间的桑白皮中总黄酮的含量差异较为明显^[13]。今后宜采用不同批次、不同产地的桑白皮进行对比试验。其二,在考察总黄酮动态吸附曲线,上样1 BV时便可检测到总黄酮量,分析原因可能为打开阀时速度未控制理想或其他操作不当,也有可能试验过程中对上样速度、提取液浓度等相关重要参数选择不合理。因此,拟在今后的研究中进一步优化此工艺,以提高桑白皮总黄酮的纯度。

参考文献

- [1] 吴志平,谈建中,顾振纶.中药桑白皮化学成分及药理活性研究进展[J].中国野生植物资源,2004,23(5):9.
- [2] 周锋,董志,李晶.桑白皮总黄酮抗糖尿病作用的初步研究[J].激光杂志,2010,9(5):93.
- [3] 张国刚,黎琼红,叶英子博,等.桑白皮抗病毒有效成分的提取分离及体外抗病毒活性研究[J].沈阳药科大学学报,2005,22(3):207.
- [4] 张静,高英,罗娇艳,等.桑白皮不同部位对实验性高脂糖尿病小鼠的影响[J].中药新药与临床药理,2014,25(2):159.
- [5] 马松涛,王秋林,张效科.桑白皮提取物对糖尿病大鼠坐骨神经传导速度及生化功能的影响[J].中国药房,2007,18(3):174.
- [6] 黄强,江丽霞,曾靖.桑白皮多糖对小鼠实验性肝损伤的保护作用[J].中国中医药现代远程教育,2014,12(3):155.
- [7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:78.
- [8] 杨方明,韦史利,鄢文力.蜜炙桑白皮总黄酮的含量测定方法[J].亚太传统医药,2011,7(6):22.
- [9] 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.
- [10] 李凤林,李青旺,冯彩宁,等.天然黄酮类化合物提取方法研究进展[J].中国食品添加剂,2008,90(5):60.
- [11] 杨文字,万德光.桑树总生物碱分析方法与提取方法的探讨[J].时珍国医国药,2008,19(5):1 043.
- [12] 郭志焯,韩丽,杨明,等.中药多糖定量测定方法的探讨[J].中成药,2014,36(10):2 172.
- [13] 段志涛,高英,周刚.桑白皮药材的质量标准研究[J].中药材,2013,36(4):553.

(收稿日期:2014-11-19 修回日期:2015-05-18)

(编辑:林 静)

《中国药房》杂志——RCCSE中国核心学术期刊,欢迎投稿、订阅