

# 响应面法优化桑叶总生物碱超声提取工艺<sup>△</sup>

贺胜<sup>1,2\*</sup>,周杏子<sup>1</sup>,何海<sup>1</sup>,何羨霞<sup>1</sup>,常化静<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 510405)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)25-3537-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.25.28

**摘要** 目的:优化桑叶中总生物碱的超声法提取工艺。方法:在单因素试验基础上,通过响应面分析法考察超声提取时间、超声功率、乙醇体积分数、料液比及提取溶剂的pH对桑叶总生物碱提取率的影响,利用Design Expert 8.0.5分析软件对试验数据进行分析,确定最优提取工艺并进行验证。结果:建立的二项式拟合模型方程复相关系数为0.969 9;优化后的桑叶生物碱提取工艺条件为超声提取时间48 min、超声功率800 W、乙醇体积分数70%、料液比1:25、pH 5。在此条件下桑叶生物碱提取率为0.422%,与模型预测值0.429%比较偏离率小于2%。结论:建立的回归模型拟合性好,提取工艺稳定可靠,可用于桑叶中总生物碱的提取。

**关键词** 桑叶;总生物碱;响应面法;超声提取工艺;优化

## Optimization of the Ultrasonic Extraction Process of Total Alkaloids from Mulberry Leaves by Response Surface Method

HE Sheng<sup>1,2</sup>, ZHOU Xing-zi<sup>1</sup>, HE Hai<sup>1</sup>, HE Xian-xia<sup>1</sup>, CHANG Hua-jing<sup>1</sup>, WU Xin-rong<sup>1</sup> (1. Dept. of Pharmacy, General Hospital of Guangzhou Military Command of PLA, Guangzhou 510010, China; 2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To optimize the ultrasonic extraction process of total alkaloids from mulberry leaves. METHODS: Based on the single factor experiment, response surface method was adopted to investigate the effects of ultrasonic extraction time, ultrasonic power, ethanol volume fraction, solid-liquid ratio and pH of solvent on the extraction rate of total alkaloids from mulberry leaves, then test data were analyzed by Design Expert 8.0.5 software, and the optimized process was confirmed and verified. RESULTS: The multiple correlation coefficient of established binomial equation fitting model was 0.969 9; the optimized condition for extracting alkaloid from mulberry leaf was ultrasonic extraction time of 48 min, ultrasonic extraction power of 800 W, ethanol volume fraction of 70%, material-liquid ratio of 1:25, pH 5. Under these conditions, the extraction rate of total alkaloids was 0.422%, with the bias ratio was less than 2% compared with the model predictions. CONCLUSIONS: The established model has good fitting performance, the extraction process is stable and reliable, and can be used for the extraction of alkaloids from mulberry leaves.

**KEYWORDS** Mulberry leaf; Total alkaloids; Response surface method; Ultrasonic extraction; Optimization

桑叶为桑科植物桑(*Morus alba* L.)的叶片,又名“神仙叶”“铁扇子”等,为《中国药典》收录品种<sup>[1-2]</sup>,其药用价值首载于《神农本草经》。桑叶具有降血糖等多种药理活性,中医一直将桑叶作为糖尿病治疗方剂的重要配伍之一<sup>[3-4]</sup>。近年来,现代药理学研究已经证明这类化合物及其衍生物可以通过抑制糖苷酶活性发挥降低血糖的作用,可用于治疗糖尿病肥胖症等疾病的治疗<sup>[5-6]</sup>。本课题组也通过细胞试验和动物模型实验发现桑叶中生物碱的降糖活性最强,黄酮次之<sup>[7]</sup>。所以,建立桑叶中生物碱稳定、高效的提取工艺很有必要。根据生物碱的分子结构特点,采用稀酸浸提法具有条件温和、提取率高的优势;传统煎煮法则会将其中的1-脱氧野尻霉素(1-DNJ)等结构破坏,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<sup>[8]</sup>。笔者在本研究中以桑叶粉为原料,采用超声法,用乙醇-稀盐酸提取桑叶总生物碱,并应用响应面法(Response surface methodology, RSM)对桑叶中生物碱的提取工艺条件进行优化,以实现高效提取桑叶中总生物碱的目的。

### 1 材料

#### 1.1 仪器

BP211D型电子天平(德国赛多利斯公司);电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司);高频恒温数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);飞鸽TDL-80-2B型离心机(上海安亭科学仪器厂);Lab Tech型紫外分光光度计(北京莱伯泰科仪器有限公司);EYELAN21001型旋转蒸发仪(日本东京理化器械株式会社)。

#### 1.2 药材

△基金项目:广东省科技计划项目(No.2011A080300004)

\* 硕士研究生。研究方向:天然药物有效部位的开发。电话:020-36653476。E-mail: wywnxhw@163.com

# 通信作者:主任药师,博士生导师,硕士。研究方向:中药筛选及药理研究。电话:020-36653476。E-mail: gzwzrong@aliyun.com

本栏目协办

南京伊登生物医学科技有限公司

地址:江苏省南京市玄武区龙蟠中路29号珠江路都市经济园312室  
邮编:210018

桑叶(广东和翔制药有限公司,批号:131201,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)。

### 1.3 试剂与树脂

4-羟基哌啶(批号:L2014057,纯度:≥98%)、雷氏盐(批号:20140331)均来源于上海晶纯试剂有限公司;丙酮、盐酸、乙醇均为分析纯,水为去离子水。

732H型阳离子交换树脂(淄博东大化工股份有限公司)。

## 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,用水浸泡树脂过夜,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为6~7备用。

### 2.2 桑叶总生物碱提取液的制备

将干燥的桑叶在植物粉碎机中粉碎,过60目筛,制成桑叶干燥粉。称取30g桑叶干粉,按一定比例加入一定体积分数乙醇-稀盐酸(调pH)使料液比为1:15,常温下超声提取30min,抽滤,合并滤液并浓缩,于5000r/min(离心半径为15cm)离心15min。收集上清液,定容至10ml,用树脂富集纯化,除去中性及酸性成分,水洗至无色后用氨水-乙醇(70:30, V/V)混合液洗脱。收集洗脱液,减压浓缩,用0.05mol/L盐酸定容至10ml量瓶中,即得。

### 2.3 桑叶总生物碱的含量检测

采用雷氏盐比色法<sup>[9]</sup>测定。以4-羟基哌啶为对照品,利用4-羟基哌啶对照品建立的回归方程计算桑叶生物碱含量。以4-羟基哌啶溶液的浓度( $x$ , mol/L)为横坐标,以在523nm波长处测定的吸光度( $y$ )为纵坐标,得方程: $y=23.154x-0.061$  ( $R^2=0.9998, n=10$ ),表明4-羟基哌啶的检测浓度线性范围为0.00404~0.0404mol/L。根据生物碱浓度,以1-DNJ摩尔质量计算生物碱的提取率。生物碱的提取率= $c \times D \times V \times M / (m \times 1000) \times 100\%$ ,其中, $c$ 为从回归方程中求得的生物碱浓度(mol/L), $D$ 为稀释倍数, $V$ 为溶液总体积(ml), $M$ 为1-DNJ的摩尔质量(g/mol), $m$ 为样品质量(g)。

**2.3.1 精密度试验** 精密吸取对照品溶液1.0ml,按雷氏盐比色法测定吸光度,重复6次,得吸光度的RSD为0.508% ( $n=6$ ),表明方法精密度良好。

**2.3.2 稳定性试验** 精密吸取对照品溶液1.0ml,按雷氏盐比色法在0、15、30、45、60、120min时测定其吸光度,计算含量的RSD为1.22% ( $n=6$ ),表明溶液在120min内基本稳定。

**2.3.3 回收率试验** 精密称定9份已知桑叶总生物碱含量的桑叶粉30g,每3份1组,按低、中、高3个水平分别精密加入一定量的对照品溶液,测定相应的生物碱含量,计算回收率,得平均回收率为96.58% (RSD=1.45%,  $n=3$ )。

### 2.4 单因素试验

在常温下,以超声提取时间30min、料液比1:15、超声功率600W、乙醇体积分数60%、提取溶剂pH6、提取2次为基础条件,分别对其中某一因素进行调整设计单因素试验。各单因素试验的水平分别为不同超声提取时间(10、20、30、40、50、60min)、超声功率(400、500、600、700、800、900W)、乙醇体积分数(20%、40%、60%、80%、100%)、料液比(1:10、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35, g/ml)以及pH(1、2、3、4、5、6、7),指标为总生物碱提取率( $Y$ )。

各试验结果如图1所示。

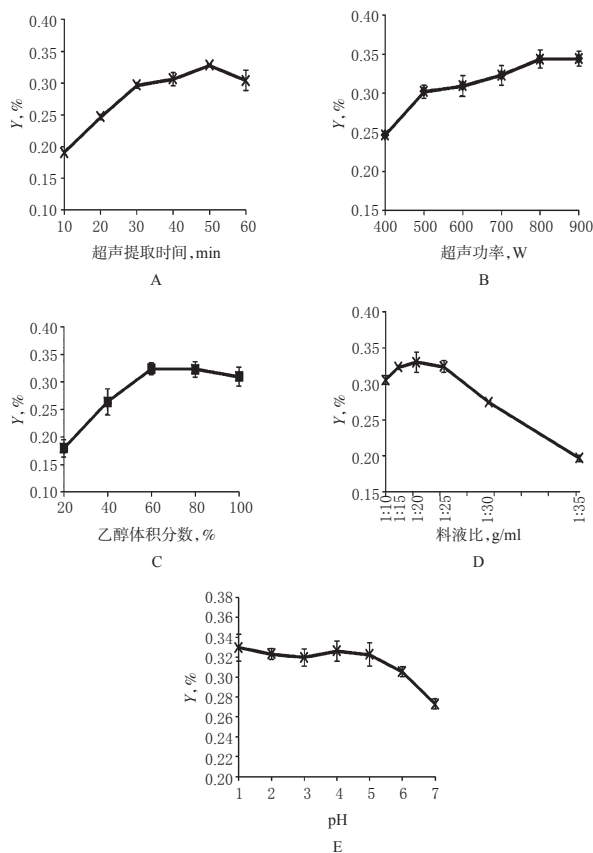


图1 不同提取工艺对桑叶生物碱提取率影响的单因素试验

A. 超声提取时间; B. 超声功率; C. 乙醇体积分数; D. 料液比; E. pH

### Fig 1 Single factor test of effects of different extraction process on the yield of alkaloid from mulberry leaves

A. ultrasonic extracting time; B. ultrasonic power; C. ethanol volume fraction; D. liquid ratio; E. pH

由图1可见,桑叶总生物碱提取率随超声提取时间延长而逐渐增加,超声提取50min时总生物碱提取率达最高值0.325%,但是在30min之后,提取率已经增长缓慢,并且在60min时提取率有下降趋势;桑叶总生物碱提取率随着超声功率变大而增加,800W时达到最大提取率,但是在600W后提取率增加变慢;乙醇体积分数在40%~80%之间时,桑叶总生物碱提取率随乙醇体积分数升高而逐渐增加,体积分数达60%后逐渐平稳,于60%时提取率达最高0.324%;同时,桑叶总生物碱提取率随料液比升高而逐渐增加,在料液比为1:25时达到最高值0.330%;桑叶总生物碱提取率随pH变化不大,在pH为2、3时略有下降,但是变化不显著,并且在pH为4后又开始上升,只有当pH大于5时桑叶总生物碱提取率开始显著降低。综上,可以确定提取桑叶生物碱的各单因素条件为:超声提取时间40~60min、超声功率700~900W、乙醇体积分数60%~80%、料液比1:25(g/ml)、提取溶剂pH4~6。

### 2.5 生物碱提取工艺条件优化

在单因素试验基础上,选取超声提取时间、超声功率、乙醇体积分数及pH为考察因素,固定提取温度为常温,料液比为1:25,以生物碱提取率( $Y$ )为响应值(试验点1~29中1、3、8和24为0点,其余均为析因点),根据Box-Behnken设计原则安排试验,因素与水平见表1,试验安排与结果见表2。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

水平	因素			
	A(提取时间),min	B(超声功率),W	C(乙醇体积分数),%	D(提取溶剂pH)
-1	40	700	60	4
0	50	800	70	5
1	60	900	80	6

表2 试验安排与结果

Tab 2 Arrangement and results of test

序号	A	B	C	D	Y, %
1	0	0	0	0	0.320
2	-1	0	1	0	0.332
3	0	0	0	0	0.325
4	0	-1	-1	0	0.313
5	0	1	0	-1	0.342
6	0	-1	1	0	0.330
7	1	0	0	1	0.263
8	0	0	0	0	0.322
9	0	0	1	-1	0.341
10	0	0	1	1	0.298
11	-1	0	-1	0	0.288
12	0	1	1	0	0.363
13	0	1	-1	0	0.337
14	0	0	-1	1	0.290
15	0	0	0	0	0.313
16	0	1	0	1	0.294
17	0	-1	0	1	0.285
18	-1	0	0	1	0.281
19	-1	-1	0	0	0.319
20	-1	1	0	0	0.325
21	-1	0	0	-1	0.320
22	0	0	-1	-1	0.303
23	1	0	-1	0	0.272
24	0	0	0	0	0.319
25	1	1	0	0	0.353
26	1	0	0	-1	0.371
27	1	0	1	0	0.379
28	0	-1	0	-1	0.366
29	1	-1	0	0	0.352

应用 Design Expert 8.0.5 软件对试验数据进行回归分析,得多元二次回归方程为  $Y=0.618-2.372 \times 10^{-3}A-2.347 \times 10^{-3}B-2.623 \times 10^{-3}C+0.210D+4.750 \times 10^{-6}AB+1.575 \times 10^{-4}AC-1.725 \times 10^{-3}AD+2.250 \times 10^{-6}BC+4.750 \times 10^{-5}BD-7.500 \times 10^{-4}CD-9.833 \times 10^{-6}A^2+1.277 \times 10^{-6}B^2+8.917 \times 10^{-6}C^2-0.124D^2$ , 二项式拟复合相关系数  $R^2=0.9699$ ,  $P<0.001$ , 各项方差分析见表3。

方差分析表明,各因素对提取效果的影响顺序为  $D>C>A>B$ , C、D、 $D^2$ 项对响应值具有极显著影响, A、AD、CD项对响应值具有显著性影响。失拟项  $P$  值为 0.014 9, 且相对于纯差不显著, 表明模式可靠。在回归方程基础上, 应用 Design Expert 8.0.5 软件绘制响应面及等高线图, 若等高线呈椭圆形则表明两个因素交互作用明显, 若呈圆形则表明交互作用不明显<sup>[10]</sup>, 结果见图2~图7。

利用统计软件 Design Expert 8.0.5 预测桑叶总生物碱提取率, 得到的优化提取工艺条件为超声提取时间 48.3 min、超声功率 768 W、乙醇体积分数 69.9%、pH 4.9、料液比 1:25(g/ml), 预测在此工艺条件下桑叶总生物碱的提取率为 0.429%; 从实际操作考虑, 将条件修正为超声提取时间 48 min、超声功率

表3 回归模型方差分析

Tab 3 Variance analysis of regression equation

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P
模型	0.020	14	$1.413 \times 10^{-3}$	5.20	0.002 6
A	$7.084 \times 10^{-4}$	1	$7.084 \times 10^{-4}$	2.60	0.013 0
B	$5.256 \times 10^{-4}$	1	$5.256 \times 10^{-4}$	1.93	0.187 8
C	$4.800 \times 10^{-3}$	1	$4.800 \times 10^{-3}$	17.65	0.001 0
D	$8.427 \times 10^{-3}$	1	$8.427 \times 10^{-3}$	30.98	0.000 1
AB	$5.641 \times 10^{-5}$	1	$5.641 \times 10^{-5}$	0.21	0.656 3
AC	$9.922 \times 10^{-4}$	1	$9.922 \times 10^{-4}$	3.65	0.078 5
AD	$1.190 \times 10^{-3}$	1	$1.190 \times 10^{-3}$	4.38	0.046 6
BC	$2.025 \times 10^{-5}$	1	$2.025 \times 10^{-5}$	0.074	0.789 3
BD	$9.025 \times 10^{-5}$	1	$9.025 \times 10^{-5}$	0.33	0.574 4
CD	$2.250 \times 10^{-4}$	1	$2.250 \times 10^{-4}$	0.83	0.037 9
A <sup>2</sup>	$5.660 \times 10^{-6}$	1	$5.660 \times 10^{-6}$	0.021	0.887 5
B <sup>2</sup>	$9.541 \times 10^{-4}$	1	$9.541 \times 10^{-4}$	3.51	0.083 7
C <sup>2</sup>	$5.021 \times 10^{-6}$	1	$5.021 \times 10^{-6}$	0.018	0.894 0
D <sup>2</sup>	$9.646 \times 10^{-4}$	1	$9.646 \times 10^{-4}$	3.55	0.002 2
残差	$3.536 \times 10^{-3}$	13	$2.720 \times 10^{-4}$		
失拟项	$3.457 \times 10^{-5}$	9	$3.841 \times 10^{-4}$	19.50	0.014 9
纯差	$7.880 \times 10^{-3}$	4	$1.970 \times 10^{-5}$		
回归统计	0.023	27			

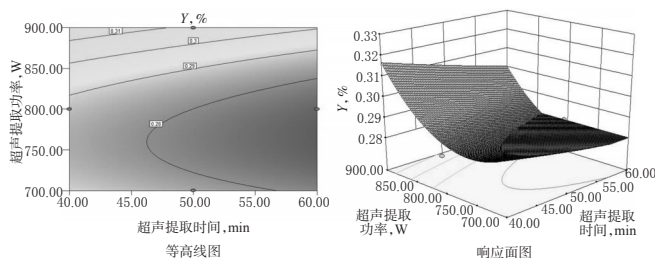


图2 超声提取时间与超声功率对桑叶总生物碱提取率的等高线和响应面图

Fig 2 Contour and response surface of ultrasonic extraction time and ultrasonic power on the mulberry leaves alkaloid extraction rate

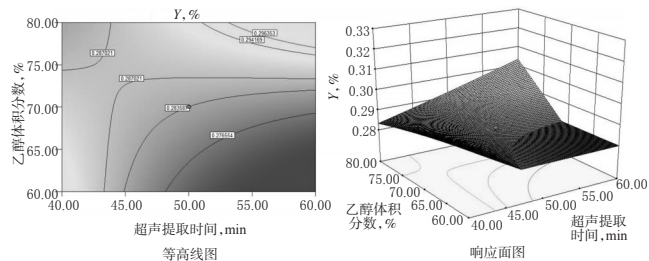


图3 超声提取时间与乙醇体积分数对桑叶总生物碱提取率的等高线和响应面图

Fig 3 Contour and response surface of ultrasonic extraction time and ethanol volume fraction on the mulberry leaves alkaloid extraction rate

800 W、乙醇体积分数 70%、pH 为 5、料液比 1:25(g/ml)。

## 2.6 验证试验

取桑叶干粉 3 份, 每份 30 g, 采用上述修正后的最优工艺进行提取, 按“2.3”项下的检测方法进行检测, 得总生物碱平均提取率为 0.422%, 与模型预测值 0.429% 间的偏离率 [(预测值-实际值)/预测值×100%] 为 1.63% (小于 2%), 并且此试验结果高于响应面试验的其他组合的结果, 表明试验模型稳定可行。



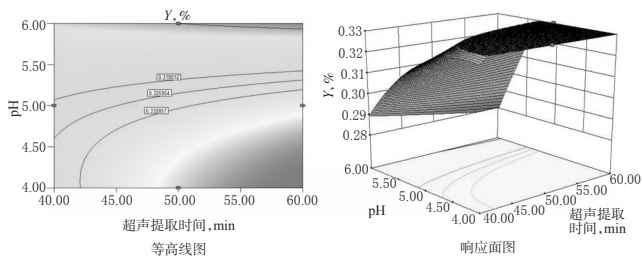


图4 超声提取时间与提取溶剂pH对桑叶总生物碱提取率的等高线和响应面图

Fig 4 Contour and response surface of ultrasonic extraction time and pH of solvent on the mulberry leaves alkaloid extraction rate

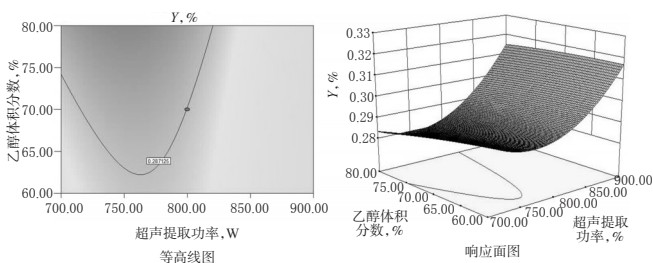


图5 超声功率与乙醇体积分数对桑叶总生物碱提取率的等高线和响应面图

Fig 5 Contour and response surface of ultrasonic power and ethanol volume fraction on the mulberry leaves alkaloid extraction rate

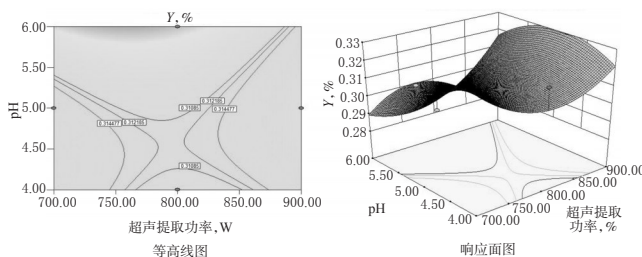


图6 超声功率与提取溶剂pH对桑叶总生物碱提取率的等高线和响应面图

Fig 6 Contour and response surface of ultrasonic power and pH of solvent on the mulberry leaves alkaloid extraction rate

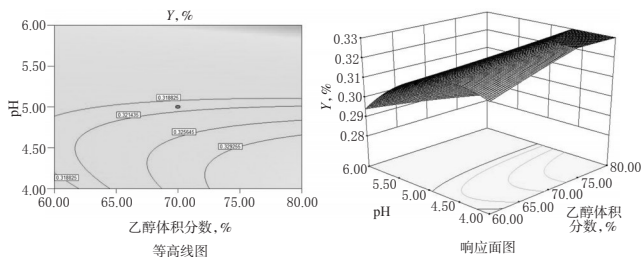


图7 乙醇体积分数与提取溶剂pH对桑叶总生物碱提取率的等高线和响应面图

Fig 7 Contour and response surface of ethanol volume fraction and pH of solvent on the mulberry alkaloid extraction rate

### 3 讨论

由于桑叶总生物碱的水溶性较大,目前的提取方法主要

有浸渍法、乙醇回流提取法和传统的煎煮法。本试验采用的超声波处理乙醇溶剂提取法,利用超声空化作用和微扰效应,能够有效地使植物细胞壁破裂,使细胞更容易释放内容物,并促进溶剂进入提取物细胞,加速成分溶入溶剂,可大大缩短提取时间并提高提取率。然后通过响应面分析法进一步优选总生物碱的提取工艺参数。

桑叶总生物碱含量测定采用经典的雷氏盐沉淀比色法,具有不需要使用昂贵的对照品(如1-DNJ)、操作简单快捷等优点。其原理是利用桑叶中总生物碱在酸性条件下转化成生物碱阳离子 $B^+$ ,该阳离子与雷氏盐(四硫氰基二氨络铬酸铵)反应后生成不溶于水的生物碱雷氏铵盐沉淀,分离沉淀后以丙酮溶解,此生物碱雷氏铵盐的丙酮溶液在523 nm波长处有最大吸收。因此,可使用具有相同母环结构的4-羟基吡啶来作为对照品。另外,由于桑叶总生物碱属于混合物,目前已知含有以1-DNJ为代表的8种多羟基吡啶类生物碱,依此测定方式得到的结果为总生物碱的摩尔浓度,为了方便提取率的计算,统一以含量最高的1-DNJ的摩尔质量(163.17 g/mol)来计算质量浓度。为减小非生物碱成分(如色素等)对该检测方法准确性的干扰,参考文献[9]采用732H型阳离子交换树脂纯化桑叶生物碱提取液,用氨水-乙醇洗脱剂洗脱,收集洗脱液进行减压干燥,氨水和乙醇易挥发不会因为溶剂残留而引入新杂质。并且供试品溶液在120 min内稳定,重现性良好。故本文建立的以4-羟基吡啶为对照品的含量测定方法可作为桑叶总生物碱含量的检测方法。

### 参考文献

- [1] 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,2010:259.
- [2] 杨晶,刘嘉琪,王宝昌,等.桑不同药用部位中黄酮类成分的定量检测[J].中国药房,2014,25(27):2550.
- [3] 何羨霞,苏楠,吴新荣.桑叶降糖有效部位及其降糖活性研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(7):245.
- [4] 刘琼,刘菊香,吴朝华,等.桑叶总碱降糖胶囊联合控制饮食运动疗法治疗2型糖尿病等效性随机平行对照研究[J].实用中医内科杂志,2013,27(4):24.
- [5] Xiao BX, Wang Q, Fan LQ. Pharmacokinetic mechanism of enhancement by radix pueraria flavonoids on the hyperglycemic effects of cortex mori extract in rats[J]. *J Ethnopharmacol*, 2014,151(2):846.
- [6] 张军,宛晓春,陆翠珍,等.桑叶生物碱类化合物研究进展[J].安徽农业大学学报,2012,39(6):146.
- [7] 常化静,何羨霞,苏楠,等. IKK/NF- $\kappa$ B信号通路对2型糖尿病及中药抗炎治疗[J].中华中医药学刊,2014,32(8):1952.
- [8] 吕志强,李乔,刘洪玲,等.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[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(14):27.
- [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] Roopa N, Chauhan OP, Raju PS, et al. Process optimization for osmo-dehydrated carambola (*Averrhoa carambola* L) slices and its storage studies[J]. *J Food Sci Technol*, 2014,51(10):2472.

(收稿日期:2014-11-24 修回日期:2015-02-16)

(编辑:刘萍)