

桑叶多糖提取工艺优选

天津中医学院 (300193) 赵 骏* 钟 蓉 王洪章 戚爱棣

摘要 通过正交实验法,并综合考虑大生产的各种因素条件,优选出桑叶多糖的提取工艺。药效学初探表明,桑叶多糖有显著的降低血糖的作用。

关键词 桑叶 多糖 提取工艺 正交实验 药效学

桑叶为桑科植物桑的叶。历代中医药书籍中有桑叶能治疗消渴症的记载。近代医家也常将桑叶用于治疗糖尿病,且得到满意疗效。目前国内外尤其是日本对桑叶的有效成分研究较多,发现其有效成分多糖具有降血糖的作用,并对多糖的结构进行了分析。我国也有人对桑叶多糖进行过研究,但尚未见对桑叶多糖提取工艺的研究。实验证明,桑叶总多糖对四氧嘧啶造成的大鼠糖尿病有显著的降血糖作用。因此提取其多糖成分制成各种中成药的前景十分广阔。我们对桑叶多糖提取工艺优选进行了研究。

1 材料、仪器和试剂

材料: 桑叶: 购于天津中医学院门诊部,对照品桑叶多糖自制; AB-8型大孔吸附树脂购于南开大学化工厂; 实验大鼠由中国中医药研究所提供。

仪器: DU5 30 核酸蛋白仪,血糖测定仪 Accutrend Boehringer Mannheim UK Ltd。

试剂: 四氧嘧啶: Sigma公司, 蒽酮、硫酸及其它试剂均为 AR级

2 提取工艺优选

本实验讨论用两种方法提取,水煎煮法和超声提取法,设计了 2个正交实验表。

2.1 水煎煮法: 水煎煮法选用 $L_{12}(3 \times 2^4)$ 因素水平,见表 1

表 1 $L_{12}(3 \times 2^4)$ 因素水平

水平	提取时间 (A) (min)	提取次数 (B)	醇沉浓度 (C) (%)
1	20	3	70
2	30	3	80
3	60		

称取桑叶 50.0 g,按表 1中条件水煎煮提取,提取液浓缩至一定体积,离心除去沉淀,上清液走柱,层析柱用 AB-8型大孔吸附树脂湿法填充,在大孔吸附树脂柱中用蒸馏水洗至洗脱液加入 95%乙醇无沉淀为止,再将洗脱液浓缩至约 50 mL,加入活性炭脱色,趁热过滤,滤液浓缩后加入 95%乙醇使含

醇量达正交表所设计的浓度,静置后抽滤,沉淀用无水乙醇、丙酮各洗 3次,60℃低温干燥,得到白色无定形粉末。经实验,白色粉末溶于水,尤易溶于热水,不溶于高浓度的乙醇和丙酮, Molish反应和蒽酮-浓硫酸反应成阳性,说明白色粉末中含多糖;茚三酮反应为阴性,说明无蛋白质。白色粉末称重,并测定其多糖含量,计算提取总量。每次实验平行做两次,见表 2

表 2 水煎煮正交实验及结果

实验号	1	2	3	4	5	收率 (g)	含量 (%)	多糖总量 (g)
	A		B					
1	1	1	1	1	1	0.968 1	30.5	0.295 6
2	1	1	1	2	2	0.962 7	31.7	0.305 5
3	1	2	2	1	2	0.821 1	37.5	0.307 6
4	1	2	2	2	1	0.822 4	38.4	0.316 0
5	2	1	2	1	1	1.885 7	39.1	0.737 5
6	2	1	2	2	2	1.175 0	39.9	0.684 1
7	2	2	1	1	1	1.582 6	41.5	0.656 3
8	2	2	1	2	2	1.664 4	44.3	0.737 7
9	3	1	2	1	2	2.393 6	39.5	0.942 5
10	3	1	1	2	1	2.872 3	38.9	1.116 8
11	3	2	1	1	2	2.247 0	42.6	0.956 1
12	3	2	2	2	1	2.511 6	51.6	1.294 7
I	1.224 7		4.068 0	3.898 3				
II _j	2.815 6		4.285 1	4.454 8				$\sum_{i=1}^{12} y_i = 8.353 1$
III _j	4.312 8							
I _j	0.306 1		0.678 0	0.649 7				$\sum_{j=1}^{12} y_i$
II _j	0.703 9		0.714 2	0.742 5				$\frac{\sum_{i=1}^{12} y_i}{12} = 5.814 5$
III _j	1.078 2							
R	0.772 1		0.036 2	0.092 8				

根据表 2的极差 R的大小,其影响因素的顺序为 A> C> B,即依提取时间、醇沉浓度、提取次数的次序减小。提取次数对实验影响不显著。分析结果认为,水煎煮提取中最佳工艺是:水煎煮 60 min,煎煮 2次,加 95%乙醇使含醇量达 80%,产量为 1.294 7 g

2.2 超声提取法: 超声提取法选用 $L_4(2^3)$ 因素水平(表 3),结果见表 4

* Address Zhao Jun, Tianjin College of Traditional Chinese Medicine, Tianjin

表 3 L₄(2³)因素水平

水平	提取时间 (A) (min)	提取次数 (B)	醇沉浓度 (C) (%)
1	20	1	70
2	30	2	80

表 4 超声提取法正交实验及结果

	1	2	3	收率 (g)	含量 (%)	多糖总量 (g)
	A	B	C			
1	1	1	1	1.7657	58.9	1.0391
2	1	2	2	1.7954	60.2	1.0799
3	2	1	2	3.6141	73.8	2.6658
4	2	2	1	3.7515	64.83	2.4321
I _j	2.1190	3.7049	3.4712			
II _j	5.0979	3.5120	3.7457			
I _j	1.0595	1.8525	1.7356			
II _j	2.5490	1.7560	1.8729			
R	1.4895	0.0965	0.1373			

根据表 4中极差 R的大小,从超声提取的直观分析表中得出的结论是 B₁C₂A₂,即超声提取 30 min,1次,使含醇量达 80%,产量为 2.6658g 其相对含量也较高

3 桑叶多糖的含量测定

3.1 桑叶多糖对照品的制备:取桑叶 50g,加水 500 mL,煎煮两次,每次 1h,合并滤液,浓缩至约 150 mL,加 9 mL 10% 三氯醋酸,放置数小时,离心除去不溶物,取上清液浓缩至 50 mL,加 95% 乙醇使含醇量达 80%,于冰箱中放置 48 h,取出抽滤,将沉淀加水溶解,过大孔吸附树脂柱 (AB-8型),用蒸馏水洗至洗脱液中加入 95% 乙醇无沉淀为止。洗脱液浓缩,加活性炭脱色处理,加入 95% 乙醇使含醇量达 80%,放置,沉淀反复用水溶,加活性炭处理再醇沉,得到白色絮状沉淀,抽滤,用无水乙醇、丙酮各洗 3次,60℃ 低温干燥得到白色无定形粉末,置于干燥器中备用。

3.2 对照品溶液的配制:精称减压干燥至恒重的桑叶多糖 50 mg,蒸馏水定容至 10 mL

3.3 标准曲线的制备:分别精密吸取桑叶多糖对照品溶液 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL置于干燥具塞试管中,补加蒸馏水至 2.0 mL,摇匀,加入 0.2% 蒽酮浓硫酸显色剂 4.0 mL,迅速摇匀,45 min后,以蒸馏水 2.0 mL加显色剂 4.0 mL为空白,按分光光度法在 620 nm处测定吸光度,得回归方程 $A = 0.0086 + 0.2637C$, $r = 0.991$,基本呈线性关系

3.4 提取物的多糖含量测定:精密称取桑叶多糖提取物 100 mg,蒸馏水定容至 10 mL,精密吸取 0.5

mL,按“标准曲线的制备”项下操作,测定 A 值并计算多糖含量

4 桑叶多糖的药效学初探

桑叶多糖提取物配成溶液,在中国中医药研究所药理组进行降血糖的预实验。实验结果表明,桑叶多糖 200 mg/kg 在给药后 4, 6 h 血糖下降率为 49.4% 和 40.1%,有较显著的降血糖作用,尤以给药后 4 h 效果明显 ($P < 0.05$)。

5 结果及讨论

5.1 从超声提取的正交实验直观分析表中可以看出,超声提取的产量明显多于水煎煮,且所耗时间、提取次数少于水煎煮法,所以可提倡使用超声波方法提取桑叶多糖。

5.2 药理初实验证实,我们采用的方法所提多糖对四氧嘧啶所造成的大鼠高血糖有明显的降血糖作用。

5.3 提取物通过 Molish 反应和蒽酮-浓硫酸反应均呈阳性, Liebermann-Burchard 反应和 Salkanski 反应均为阴性,说明提取物中无甾醇类化合物。

参考文献

1 陈福君,等. 沈阳药科大学学报, 1996, 13(1): 25
 2 刘重芳,等. 中成药, 1997, 10: 6
 3 袁晓华,等主编. 植物生理生化实验. 北京: 北京高等教育出版社, 1983: 1

(1999-08-24 收稿)

敬告读者

《中草药》杂志编辑部尚存部分过刊合订本,包括: 1974~ 1976年, 1978年, 1979年, 1985年, 1986年, 1988~ 1990年, 1992~ 1994年 (50元/年); 1995~ 1997年 (102元/年); 1998年 (120元); 1999年 (130元); 1996年增刊 (50元); 1997年增刊 (45元); 1998年增刊 (55元); 1999年增刊 (70元)。欢迎来函来电订购,电话: 022- 27474913