

裹作用,使得醇沉物中留有较大量的靛玉红^[6]。研究表明,板蓝根醇沉物具有明显的清热解毒作用,并对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌等的生长均有明显的抑制作用,其作用强度与同剂量板蓝根颗粒剂前浸膏相当^[7]。板蓝根醇沉物中靛玉红的量明显高于板蓝根颗粒剂前浸膏,说明板蓝根醇沉物中含有一定的药理活性物质。

对原料及成品的主要成分进行比较可以看出,产品的含氮量明显高于原料。作为饲料添加剂,既含有大量的蛋白质,菌体中又富含维生素、多种酶及辅助因子等成分,可为动物生长提供丰富的营养。同时,醇沉物经过发酵后有效成分靛玉红的质量分数仍然高达 0.45 $\mu\text{g/g}$,残留的靛玉红也可发挥清热解毒的作用。

醇沉物中的糖分以多糖为主,而多数微生物只能以小分子的单糖、双糖作为碳源,因此需要对其中的多糖进行水解,成为可发酵性糖。多糖水解分为酶水解和酸水解两种,考虑到酸水解条件比较剧烈,温度高,时间长,所需 pH 值在 1.5~1.8,水解结束后调节 pH 值会带入较多的金属离子,不利于菌体的生长,因此选择条件较温和的双酶法进行水解。

高质量浓度的还原糖对酵母菌生长具有抑制作用,应当将发酵液初始还原糖质量浓度控制在 5% 以下。在对数生长后期,随着菌体的大量繁殖,发酵液中还原糖等营养物质被耗尽,有害代谢产物不断积累,使得菌体的生长速率下降。为了提高培养液中的菌体数,可在对数生长后期,采用分批补料或流加

补料的方式,向发酵液中补加还原糖,以延长菌体的对数生长期,从而获得高密度培养液。

我国是中草药种植、生产加工和消费的大国,近年来随着对中药资源开发力度的不断加大,中药材加工产生的废弃物也越来越多。这些药渣中的绝大多数均作为废料被扔掉或烧毁,这其中有尚未提取完全的有效成分及未开发的新用途。本研究中探讨了利用板蓝根醇沉物培养益生菌的方法,不仅有效解决了污染问题,并且使原料资源得到了更充分合理有效的利用,提高了产品的附加值,同时为采用相似工艺进行生产的其他中药的综合利用提供参考。

References:

- [1] Zhang R Z, Zhang Y W. The researching progress of indigowoad root [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31 (6): 474-476.
- [2] Sun P, Li Y, Gu C Z, et al. Microwave extraction and content determination of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. polysaccharide [J]. *Primary J Chin Mater Med* (基层中药杂志), 2001, 15 (6): 22-23.
- [3] Tianjin Institute of Light Industry, Wuxi Institute of Light Industry. *Industrial Fermentation Analysis* (工业发酵分析) [M]. 2nd ed. Beijing: China Light Industry Press, 1997.
- [4] Du L X. *Technology of Industrial Microbiology* (工业微生物技术) [M]. Tianjin: Tianjin Science and Technology Press, 1992.
- [5] Sun T S. Controlling factors of microorganic metabolism during fermentation [J]. *Chin Condiment* (中国调味品), 1994 (10): 2-5.
- [6] Huang J, Huang L. Improvement of extraction process of indigowoad root granule [J]. *West China J Pharm Sci* (华西药科学杂志), 1999, 14 (5-6): 381-382.
- [7] Xu Q T, Du G J, Lin H H. Pharmacological study on alcohol deposit of *Radix Isatidis* [J]. *Chin Hosp Pharm J* (中国医院药科学杂志), 2003, 23 (10): 587-589.

桑叶中多糖提取分离工艺的研究

张琳华,高瑞昶,许明丽

(天津大学化工学院,天津 300072)

摘要:目的 优选桑叶多糖提取分离最佳工艺。方法 比较稀酸、稀碱、蒸馏水 3 种提取方法,采用 $L_9(3^4)$ 正交试验,对影响多糖的水提取工艺和醇沉分离工艺的因素水平进行了研究,并比较了不同蛋白去除法对多糖提取分离的影响。结果 桑叶多糖的最佳提取工艺为用 10 倍量蒸馏水在 70 $^{\circ}\text{C}$ 下提取 2 次,每次 1.5 h。醇沉分离最佳工艺为醇沉时乙醇体积分数 80%,药液浓缩至 1 mL 药液/g 生药,pH 值为 4。用三氯乙酸(TCA)法去除蛋白质的效果优于传统的 Savage 法。结论 优选的桑叶多糖提取分离工艺稳定可行。

关键词:桑叶;多糖;提取分离;正交试验

中图分类号:R284.2

文献标识码:B

文章编号:0253-2670(2005)04-0534-04

收稿日期:2004-07-02

作者简介:张琳华(1976—),女,上海人,1999年毕业于四川大学食品科学与工程系,现为天津大学化工学院制药工程专业 2002 级在读硕士,研究方向为药用天然产物的研发。Tel: (022) 27457016 E-mail: elley2001@sina.com.cn

Extraction and isolation technology of polysaccharide from mulberry leaves

ZHANG Lin-hua, GAO Rui-chang, XU Ming-li

(School of Chemical Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Key words: mulberry leaf; polysaccharide; extraction and isolation; orthogonal test

桑叶,又名“铁扇子”,为桑科植物桑 *Morus alba* L. 的叶,是药食两用的中药,始载于《神农本草经》,味苦、甘,性寒,归肺、肝经,具有疏风清热、平肝明目的功效。历代中医药书籍中记载桑叶能够治疗消渴症,现代药理研究表明桑叶多糖具有显著的降血糖作用,对大鼠四氧嘧啶型糖尿病有治疗效果^[1,2],因此提取多糖成分开发降糖新药和功能性食品具有重要的学术意义和实用价值。本实验对桑叶不同提取工艺所得多糖进行了比较,采用正交试验法确定最佳水提取和醇沉分离工艺,并比较了不同方法去除蛋白质的效果,为生产提供依据。

1 材料和仪器

桑叶购于天津市安舜大药房,所用试剂均为国产分析纯。752 型紫外-可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司),R-201 旋转蒸发器(上海申顺生物科技有限公司),pHS-3C 精密 pH 计(上海雷磁仪器厂),ALPHA 1-2 真空冷冻干燥机(德国 CHRiST 公司),FA/IA 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司)。

2 方法和结果

2.1 原料预处理:将桑叶粉碎、过筛,加入一定体积 95%乙醇,使溶液中乙醇的体积分数达到 80%,回流 4 h,间隙搅拌。回流完毕,离心分离取滤渣,滤渣风干,备用。

2.2 桑叶多糖的测定^[3]

2.2.1 对照品溶液的制备:精密称取葡萄糖对照品(105℃干燥至恒重)100 mg,置于 100 mL 量瓶中,加水适量使溶解,稀释至刻度,摇匀。精密吸取 10 mL 置于 100 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,即得。

2.2.2 标准曲线的绘制:准确吸取葡萄糖对照品溶液 0.05、0.10、0.20、0.30、0.40、0.60、0.80 mL,用蒸馏水补到 1.00 mL。分别加入 4.00 mL 0.2%蒽酮-硫酸试剂,迅速浸于冰水浴中冷却,各管加完后一起浸于沸水浴中,管口加盖玻璃球,以防蒸发。自水浴重新煮沸起,准确煮沸 10 min 取出,自来水冷却,室温放置 10 min 左右。以同样处理的重蒸水为空白,于 620 nm 处测定。以吸光度值为纵坐标,葡萄糖质量浓度为横坐标,绘制标准曲线,计算得回归方程: $Y = 0.09219 + 6.54638X$, $r = 0.99975$,结

果表明葡萄糖在 20~100 $\mu\text{g/mL}$ 与吸光度呈良好的线性关系。

2.2.3 测定:精密称取桑叶多糖提取物 50 mg,加水适量使溶解,蒸馏水定容至 50 mL 量瓶中,摇匀。精密吸取 1 mL,按 2.2.2 项下操作,测定吸光度值,计算多糖的质量分数。

2.3 浸膏得率的测定:采用重量法。精密量取等量的提取液(m),置于已干燥至恒重的蒸发皿中(m_0),水浴浓缩干,于 105℃干燥 3 h,移至干燥器中,冷却至室温,迅速精密称定质量(m_1),按公式 $(m_1 - m_0)/m \times 100\%$ 计算浸膏得率。

2.4 多糖提取工艺的优选

2.4.1 不同提取方法比较:称取桑叶 50 g,分别加入 0.3 mol/L 稀盐酸溶液、0.5 mol/L 稀氢氧化钠溶液、蒸馏水,恒温水浴中进行浸提,离心后取上清液,减压浓缩后加入 95%乙醇醇沉,离心取沉淀,将沉淀用无水乙醇、无水乙醚、丙酮洗涤,真空冷冻干燥,得桑叶多糖粗品,测定多糖的质量分数。各自在相同的条件下重复操作 3 次,结果见表 1。以稀碱作为提取剂,浸提混合物浓稠,不易离心,加入乙醇后,溶液无明显絮状沉淀,沉淀物不能被彻底离心,所得沉淀物呈黏性半溶液状。稀酸浸提混合物也比较黏稠,所得粗多糖的质量分数较低。可能是因为稀酸、稀碱易使多糖发生糖苷键的断裂,使部分多糖发生水解。而采用蒸馏水作为提取剂较易操作,粗多糖的质量分数也高,故以蒸馏水作为提取剂。

表 1 提取方法的比较 ($n=3$)Table 1 Comparison of extracting methods ($n=3$)

提物剂	多糖/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)
稀 HCl	0.95
稀 NaOH	1.73
蒸馏水	1.97

2.4.2 蒸馏水提取条件的优选:影响水提取多糖工艺的因素很多,通过预备试验选择 4 个主要因素:加水量(A)、提取时间(B)、提取温度(C)、提取次数(D),每个因素各取 3 个水平(表 2),在平行操作下,按 $L_9(3^4)$ 正交试验,以多糖的质量分数、干浸膏得率为提取效果的评价指标对水提取工艺条件进行优化,结果见表 3。对结果进行统计学处理,方差分析结果见表 4。

表 2 工艺优化的因素水平

Table 2 Factors and levels of optimum technology

水平	因 素			
	A/倍	B/h	C/℃	D/次
1	8	0.5	70	1
2	10	1.0	80	2
3	12	1.5	90	3

表 3 L₉(3⁴)正交试验结果

Table 3 Result of L₉(3⁴) orthogonal test

编号	A	B	C	D	浸膏得率	多糖 Y _i /	
					Xi/%	(mg·g ⁻¹)	
1	1	1	1	1	10.48	1.01	
2	1	2	2	2	14.48	1.69	
3	1	3	3	3	11.00	1.53	
4	2	1	2	3	8.84	1.46	
5	2	2	3	1	13.44	1.79	
6	2	3	1	2	15.76	2.11	
7	3	1	3	2	8.08	0.92	
8	3	2	1	3	15.96	1.45	
9	3	3	2	1	14.24	1.42	
干 膏 得 率	K ₁	35.96	27.40	42.20	38.16	ΣXi=112.28	
	K ₂	38.04	43.88	37.56	38.32	(ΣXi) ² /9=1 400.76	
	K ₃	38.28	41.00	32.52	35.80		
	k ₁	11.99	9.13	14.07	12.72		
	k ₂	12.68	14.63	12.52	12.77		
	k ₃	12.76	13.67	10.84	11.93		
	R	0.77	5.50	3.23	0.84		
	SS	1.08	51.64	15.62	1.32		
	多 糖	K ₁	4.23	3.39	4.57	4.22	ΣYi=13.38
		K ₂	5.36	4.93	4.57	4.72	(ΣYi) ² /9=19.89
K ₃		3.79	5.06	4.24	4.44		
k ₁		1.41	1.13	1.52	1.41		
k ₂		1.79	1.64	1.52	1.57		
k ₃		1.26	1.69	1.41	1.48		
R		0.53	0.56	0.11	0.16		
SS		0.44	0.58	0.02	0.04		

表 4 方差分析

Table 4 Variance analysis

	方差来源	离差平方和	自由度	方差	F 值	显著性
浸膏 得率	A(误差)	1.08	2	0.54		
	B	51.64	2	25.82	47.81	P<0.05
	C	15.62	2	7.81	14.46	
	D	1.32	2	0.66	1.22	
多糖	A	0.44	2	0.22	18.33	
	B	0.58	2	0.29	24.17	P<0.05
	C(误差)	0.024	2	0.012		
	D	0.042	2	0.021	1.75	

$F_{0.05}(2,2)=19$ $F_{0.01}(2,2)=99$

分析可知,以浸膏得率为评价指标,各因素对提取效果的影响程度依次为 B(提取时间)>C(提取温度)>D(提取次数)>A(加水量),B 因素影响差异有显著性,直观分析表明浸膏得率最高的工艺为 A₃B₂C₁D₂;以桑叶多糖的质量分数为评价指标,各因素对提取效果的影响程度依次为 B(提取时间)>

A(加水量)>D(提取次数)>C(提取温度),B 因素影响差异也有显著性,直观分析表明桑叶多糖的质量分数最高的工艺为 A₂B₃C_{1,2}D₂。综合上述两项考察指标,由于对于干膏得率 A₂ 与 A₃ 相差不大,同时应以桑叶多糖的质量分数为主要指标,故确定最佳提取工艺为 A₂B₃C₁D₂,即加水 10 倍量,提取时间 1.5 h,提取温度 70 ℃,提取次数 2 次。

2.5 醇沉条件的优选:影响醇沉效果的主要因素有乙醇体积分数(A)、药液的浓缩程度(B)、pH 值(C)。以蒸馏水为提取剂,采用水浸提最佳工艺提取多糖,以上述 3 个因素为考察因素,每个因素各取 3 个水平(表 5),在平行操作条件下,按 L₉(3⁴)正交设计试验,以多糖的质量分数作为醇沉效果的评价指标(表 6)。对结果进行统计学处理,得方差分析(表 7)。

表 5 醇沉条件的因素水平

Table 5 Factors and levels of alcohol precipitation

水平	因 素		
	A/%	B/(mL 药液·g ⁻¹ 生药)	C pH 值
1	80	1	8
2	70	2	6
3	60	3	4

表 6 L₉(3⁴)正交试验结果

Table 6 Result of L₉(3⁴) orthogonal test

编 号	A	B	C	D(误差)	多糖 Xi
					/(mg · g ⁻¹ 生药)
1	1	1	1	1	3.88
2	1	2	2	2	3.92
3	1	3	3	3	3.77
4	2	1	2	3	3.14
5	2	2	3	1	2.96
6	2	3	1	2	2.32
7	3	1	3	2	3.11
8	3	2	1	3	2.44
9	3	3	2	1	2.19
K ₁	11.57	10.13	8.64	9.03	ΣXi=27.73
K ₂	8.42	9.32	9.25	9.35	CT=(ΣXi) ² /9=85.44
K ₃	7.74	8.28	9.84	9.35	
k ₁	3.86	3.38	2.88	3.01	
k ₂	2.81	3.11	3.08	3.12	
k ₃	2.58	2.76	3.28	3.12	
R	1.28	0.62	0.40	0.11	
SS	2.783 8	0.573 4	40.240 0	0.023 0	

表 7 方差分析

Table 7 Variance analysis

方差来源	离差平方和	自由度	方差	F 值	显著性
A	2.783 8	2	1.391 9	116.00	P<0.01
B	0.573 4	2	0.286 7	23.90	P<0.05
C	0.240 0	2	0.120 0	10.00	
D(误差)	0.023 0	2	0.012 0		

$F_{0.05}(2,2)=19$ $F_{0.01}(2,2)=99$

结果分析可知,以多糖的质量分数为评价指标,

各因素对醇沉效果的影响程度依次为 A(乙醇体积分数)>B(药液浓缩程度)>C(pH 值),A 因素影响差异有高度显著性,B 因素影响差异有显著性,直观分析表明多糖的质量分数最高的工艺为 A₁B₁C₃,即醇沉时乙醇体积分数为 80%,药液浓缩至 1 mL 药液/g 生药,药液 pH 值为 4。

2.6 验证试验:据筛选所得最佳提取工艺 A₂B₃C₁D₂ 和最佳醇沉工艺 A₁B₁C₃,进行正交验证试验,得桑叶多糖质量分数为 4.05 mg/g 生药($n=3$)。

2.7 不同蛋白去除法对多糖提取的影响:醇沉时与多糖一起沉淀下来的蛋白质对多糖测定值及纯度产生很大的影响,一般采用 Savage 法除去蛋白质,蛋白质总去除率可达 89.47%,但同时多糖损失达 37.62%(表 8),且有大量不溶于水的颗粒沉淀物产生和粗多糖颜色较深,不利于粗多糖的进一步纯化。采用三氯乙酸(TCA)法代替 Savage 法,一次去除蛋白质后,上清液中蛋白质就降至 Savage 法 5 次除蛋白的结果,此时多糖的损失率仅为 12.87%。实验中还发现,采用 TCA 法处理后溶液中的色素随着蛋白质的沉淀而部分除去。可见用 TCA 法去除蛋白质的效果优于传统的 Savage 法。

3 讨论

3.1 桑叶多糖的提取中,原料的预处理用 80%乙醇回流,目的是为了除去桑叶中单糖、双糖、低聚糖、苷类、生物碱、氨基酸及醇溶性蛋白质等物质。

表 8 Savage 法与 TCA 工艺参数比较

Table 8 Comparison of Savage and TCA method parameter

参 数	Savage 法	TCA 法
蛋白去除率/%	89.47	97.25
多糖损失率/%	37.62	12.87
色素去除	无明显减少	随蛋白去除而大量去除
溶剂用量	正丁醇、氯仿消耗量大	少量三氯乙酸水溶液

3.2 桑叶多糖的水提取和醇沉分离是不同的工艺过程,故对水提取和醇沉分离分别采用正交试验来获得最佳水提取工艺和醇沉分离工艺是有必要的。经过验证,优选的桑叶多糖提取分离工艺稳定可行。

3.3 水提醇沉是多糖提取中较常用的方法,本实验优化了水提取工艺和醇沉分离。目前一些新技术、新方法如超声提取技术、微波萃取技术、酶法等也用于多糖的提取分离中,因此有必要采取这些新技术、新方法提取桑叶多糖并与传统方法相比较。

References:

- [1] Chen F J, Lu J, Zhang Y Y. Pharmacological studies on *Morus* (I): Effect of total polysaccharide of *Morus* (TPM) on carbohydrate metabolism in diabetic mice [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 1996, 13 (1): 24-27.
- [2] Hosseinzadeh H, Sadeghi A. Antihyperglycemic effects of *Morus nigra* and *Morus alba* in mice [J]. *Pharm Pharmacol Lett*, 1999, 9 (2): 63-65.
- [3] Ou Y Z, Li Y H, Su S L, et al. Determination of polysaccharide in leaves of *Morus alba* L. [J]. *Food Sci* (食品科学), 2003, 24 (11): 118-120.

双黄连滴丸制备工艺的研究

李群力

(金华职业技术学院医学院,浙江 金华 321000)

摘要:目的 研究双黄连滴丸的制备工艺。方法 以滴制温度、冷却剂温度为主要因素,设计正交试验制备双黄连滴丸,测定溶散时限等各项指标。结果 最佳条件以滴制温度 90℃,冷却剂温度 5℃为宜。结论 工艺简便可行,评分指标可靠、合理。

关键词:双黄连滴丸;正交试验;综合评分

中图分类号:R284.2

文献标识码:B

文章编号:0253-2670(2005)04-0537-03

Preparation technology of Shuanghuanglian Dropping Pill

LI Qun-Li

(School of Medicine, Jinhua College of Profession and Technology Science Engineering, Jinhua 321000, China)

Key words: Shuanghuanglian Dropping Pill; orthogonal test; comprehensive score