

文章编号:1673-1689(2009)06-0845-05

## 超声波法提取1-脱氧野尻霉素

花俊丽, 刘树兴\*, 陈素娟

(陕西科技大学 生命科学与工程学院, 陕西 西安 710021)

**摘要:** 研究了利用超声波强化法从桑叶中提取1-脱氧野尻霉素(DNJ)。以乙醇溶液为浸提剂, 超声波强化为辅助条件, 提取了桑叶中的DNJ。考察了超声功率、料液配比、超声温度以及超声时间等因素对DNJ提取率的影响。结果表明: 提取DNJ的最佳条件是超声功率125 W, 每克桑叶浸提剂用量40 mL, 超声温度70 ℃, 超声时间20 min, DNJ的得率为0.091%, 固形物中DNJ纯度为27.2%。

**关键词:** 桑叶; 1-脱氧野尻霉素; 超声波强化; 提取

**中图分类号:** Q 53

**文献标识码:** A

### Study on Ultrasonic Extraction of 1 - Deoxynojirimycin (DNJ) from Mulberry Leaves

HUA Jun-li, LIU Shu-xing, CHEN Su-juan

(School of life Science and Engineering, Shaanxi University of Science & Technology, Xi'an 710021, China)

**Abstract:** In this study, an ultrasonic-assisted extraction method was developed to extract 1-deoxynojirimycin (DNJ) from mulberry leaves and the process parameters of extraction were optimized by single factor experiment and orthogonal experiment. and acquired as follows: the ultrasonic power of 125 W, solid to water ratio of 1 : 40, the extraction temperature of 70 ℃, and the extraction time of 20 min. with the optimum conditions, The yield and purity of DNJ was achieved at 0.091% and 27.2%.

**Key words:** mulberry leaves, DNJ, Ultrasonic strengthen, extraction

桑叶(mulberry leaves), 异名铁扇子, 为桑科植物桑树(*Morus alba* L.)的叶子, 是国家卫生部公布的药食两用的植物叶, 其味苦、甘, 性寒, 归肺, 肝经, 具有疏散风热、清肺润燥、清肝明目、凉血的功效<sup>[1-2]</sup>。现代药理研究表明, 桑叶营养丰富, 含有人体必需的氨基酸、维生素、无机盐、黄酮类、生物碱类、多糖等多种功能性成分<sup>[3]</sup>。其中1-脱氧野尻

霉素(DNJ)是桑叶的特有成分。

有文献报道, 糖尿病成为仅次于心血管病、癌症的第3致死疾病, 全球的糖尿病患者已达1.5亿, 而且数目呈增长趋势。现代研究表明, 1-脱氧野尻霉素可以明显抑制餐后血糖急剧升高的现象, 延缓糖尿病的发作和恶化<sup>[4-5]</sup>。关于DNJ提取工艺的报道甚少, 可查文献仅有胡瑞军<sup>[6]</sup>微波法提取DNJ的

收稿日期: 2008-11-26

基金项目: 咸阳市科技基金计划项目(xk07001-3)。

\* 通讯作者: 刘树兴(1962-), 男, 河南新乡人, 理学硕士, 教授, 主要从事食品添加剂的研究。

Email: liusx@sust.edu.cn

报道。文献中DNJ的测定多用高效液相色谱柱前衍生化法,这种方法操作复杂,且检测成本高。作者采用乙醇为浸提剂,在水浴提取的基础上追加超声波振荡,初步研究DNJ提取工艺的同时,以紫外分光光度法跟踪测定DNJ的含量,此方法简单、快速、操作成本较低,为以后的桑叶综合利用、开发研制降血糖药品和保健食品提供了技术支持。

## 1 材料与方 法

### 1.1 原料与主要试剂

桑叶采自陕西省渭南市;蒸馏水、DNJ(纯度>97%),以及无水乙醇、三氯乙酸、氨水、碘、碘化钾、正丁醇等,均为AR级。

### 1.2 主要仪器

FW-400A粉碎机,北京科伟仪器有限公司制;JA5003型电子天平,上海精科天平厂制;超声波清洗仪,北京化玻联医疗器械有限公司制;754型紫外分光光度计,上海第三分析仪器厂制;SHB23型循环水多用真空泵,郑州杜甫仪器厂制;RE-52A旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器厂制;TDL-5-A型低速台式大容量离心机,上海安亭科学仪器厂制。

### 1.3 方 法

**1.3.1 紫外分光光度法测定波长的选择** 取0.5 mg/mL DNJ标准品溶液5 mL置于25 mL容量瓶,加一定量的wagner(碘-碘化钾)试剂<sup>[7]</sup>显色并用水定容,振荡摇匀,用754型紫外分光光度计在240~450 nm范围内扫描,确定DNJ的最大吸收波长。

**1.3.2 样品的制备** 先将桑叶粉碎,准确称取桑叶粉1 g,置于烧杯中,在室温下,用乙醇溶液在超声波振荡下提取,抽滤取滤液,加一定量的三氯乙酸,静置过夜,离心取上清液,用旋转蒸发仪浓缩。浓缩液冷却后用正丁醇萃取3次,合并正丁醇相,挥去正丁醇,真空冷冻干燥得到DNJ。

**1.3.3 标准曲线的绘制** 取0.02 mg/mL的DNJ标准品溶液,加一定量的wagner试剂,精确吸取0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mL,分别加蒸馏水至25 mL定容。以蒸馏水为参比液,用紫外分光光度计测定DNJ的量和吸光度的关系,以DNJ的质量浓度为横坐标,以吸光度为纵坐标,做标准曲线,计算得回归方程。

**1.3.4 得率的计算** 取一定量的待测溶液置于25 mL容量瓶中,加入一定量的wagner试剂,定容,振荡摇匀,在1.3.1所得出的最大吸收波长下进行测定,得出其吸光度,根据标准曲线方程得出相应的质量浓度,并按照下式计算得率:

$$\text{DNJ的得率} = (C \cdot n \cdot V / W) \times 100\%$$

式中:C为标准DNJ的质量浓度(mg/mL),n为稀释倍数,V为配成溶液体积(mL),W为桑叶质量(g)。

**1.3.5 纯度的计算** 将桑叶粗提液测定,计算出相应的DNJ质量浓度,取出一定体积的粗提液置于干燥箱,在50℃条件下,烘干至恒质量。并按照下式计算纯度:

$$\text{DNJ纯度} = (C \cdot n \cdot V / m) \times 100\%$$

式中:C为标准DNJ的质量浓度(mg/mL),n为稀释倍数,V为配成溶液体积(mL),m为粗提物烘干后质量(g)。

### 1.3.6 超声辅助提取单因素试验

**提取溶剂的选择:**按1.3.2步骤,选乙醇体积分数分别为55%、65%、75%、85%、95%,按每克桑叶浸提剂用量30 mL,提取温度70℃,超声提取10 min,提取一次并测其吸光度,计算得率。

**超声功率对提取率的影响:**按1.3.2步骤,选功率分别为100、125、150、175、200 W,按每克桑叶浸提剂用量30 mL,提取温度70℃,超声提取10 min,提取一次并测其吸光度,计算得率。

**料液配伍对提取率的影响:**按1.3.2步骤,每克桑叶浸提剂用量10、20、30、40、50 mL,以上法选取的最佳功率在70℃下超声提取10 min,提取一次,均稀释到同样的体积,测定吸光度,计算得率。

**温度对提取率的影响:**按1.3.2步骤,在温度分别为50、60、70、80、90℃下,于同上最佳功率、上法选取的最佳料液配伍下超声提取10 min,提取一次并测其吸光度,计算得率。

**超声时间对提取率的影响:**按1.3.2步骤,以同上最佳功率、同上最佳料液配伍、上法选取的最佳温度下,分别超声提取10、20、30、40、50 min,提取一次并测其吸光度,计算得率。

**1.3.7 DNJ的超声提取正交试验** 通过单因素试验,选择在超声提取过程中影响较大的超声功率、料液配伍、超声温度、超声时间4个因素进行正交试验。

## 2 结果与分析

### 2.1 紫外分光光度法测定波长的选择

碘-碘化钾(wagner)试剂和生物碱DNJ反应生成棕红色络合物( $\text{AIK} \cdot \text{HI} \cdot \text{In}$ , AIK代表生物碱DNJ),在紫外条件下可将其检出。

通过扫描DNJ标准溶液确定DNJ的最大吸收波长。如图1所示, DNJ在284 nm和356 nm处都有吸收峰。比较两个峰形,在284 nm处峰值高而

尖,而356 nm处低且宽,而且356 nm接近可见光。为了保证检测的灵敏度,选取DNJ的最大吸收波长为284 nm。

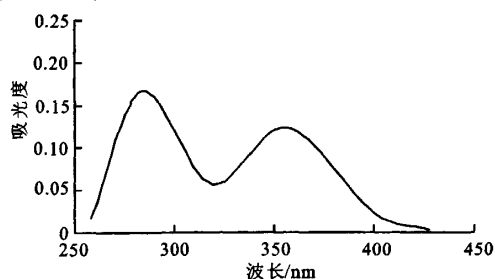


图1 DNJ的紫外吸收光谱

Fig.1 UV spectrum of DNJ

## 2.2 标准曲线的绘制

以蒸馏水为参比液,用754型紫外-可见分光光度计在284 nm对样品分别进行扫描,测定吸光度。经比色测定得回归方程为 $A=0.0918C-0.015$ ,  $R^2=0.9901$ ,表明在一定范围内,DNJ的含量与吸光度具有一定线性关系。

## 2.3 浸提剂的选择

一般情况下,在较高体积分数的乙醇溶液中,多糖类沉淀、蛋白质变性凝聚析出。由图2可以看出,当乙醇体积分数为65%时,DNJ的得率最大。所以选择体积分数65%的乙醇作为浸提剂,还可以减少多糖类、蛋白质类的干扰。

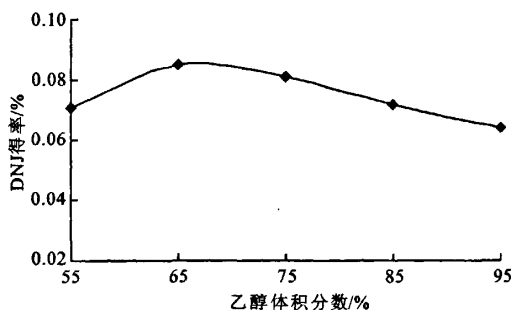


图2 乙醇体积分数对DNJ得率的影响

Fig.2 Effect of ethanol concentration on the DNJ extraction ratio

## 2.4 超声波提取法各因素的确定

**2.4.1 不同超声功率的影响** 由图3可知,随着功率的增大,DNJ的得率是增加的。但当功率大于150 W时,DNJ的得率出现下降趋势,这可能是由于溶出液的黏度增加,在后期的正丁醇萃取过程中损耗增加,所以呈下降趋势。

**2.4.2 不同料液配比的影响** 由图4可知,随着料液配比的增大,DNJ的提取得率是增加的。当每克桑叶的浸提剂用量大于30 mL,增加效果不再明

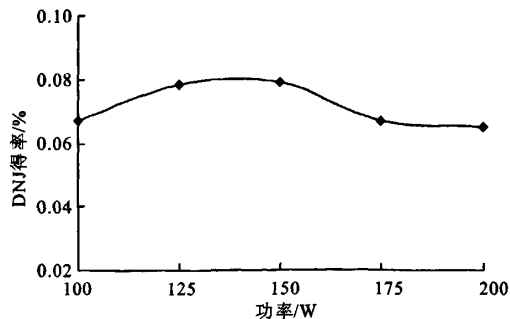


图3 超声功率对DNJ得率的影响

Fig.3 Effect of ultrasonic power on the DNJ extraction ratio

显。说明当每克桑叶的浸提剂用量为30 mL,有效成分与浸提剂之间基本达到溶解平衡,所以继续增加浸提剂量,提取得率不会明显增加。

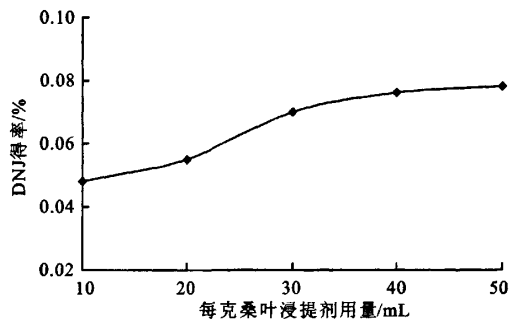


图4 料液比对DNJ得率的影响

Fig.4 Effect of the solid-liquid rate on the DNJ extraction ratio

**2.4.3 不同温度的影响** 由图5可知,随着温度的升高,DNJ得率是增加的。但当温度增加到一定程度,得率出现下降趋势,这可能是由于DNJ对热不稳定,在较高温度下易分解,从而导致DNJ得率降低。

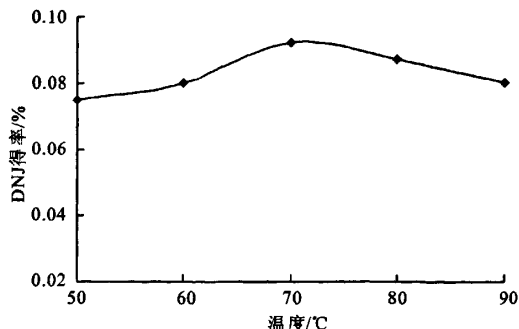


图5 温度对DNJ得率的影响

Fig.5 Effect of the temperature on the DNJ extraction ratio

**2.4.4 不同超声时间的影响** 由图6可知,当超声时间较短时,DNJ和浸提剂之间未达到溶解平

衡,所以得率较小。当时间超过 30 min 时,DNJ 得率随着时间的增加而减小。可能是由于超声时间越长,溶出的杂质越多,在正丁醇萃取时出现乳化现象而使损耗增加,从而导致得率减小。

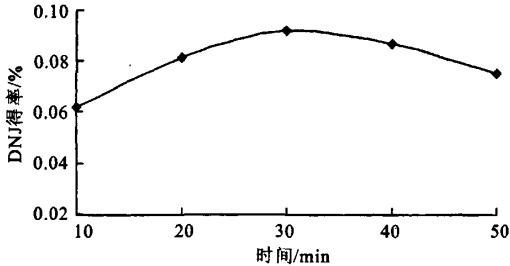


图6 超声时间对DNJ得率的影响

Fig.6 Effect of ultrasonic time on the DNJ extraction ratio

## 2.5 桑叶DNJ和多糖提取正交试验结果

根据单因素试验结果,选取提取率较高的功率、料液配比、温度和时间进行  $L_9(3^4)$  正交试验。见表1、2、3。

表1 正交试验表

Tab.1 The factor and levels of orthogonal experiment

水平	因素			
	A 功率/ W	B 浸提剂 用量/mL	C 温度/ ℃	D 时间/ min
1	100	20	60	20
2	125	30	70	30
3	150	40	80	40

表2 DNJ超声波提取正交试验结果

Tab.2 The extract of results of DNJ with orthogonal design experiment

试验号	因素				得率/%
	A 功率	B 浸提剂用量	C 温度	D 时间	
1	1	1	1	1	0.062
2	1	2	2	2	0.072
3	1	3	3	3	0.076
4	2	1	2	3	0.079
5	2	2	3	1	0.081
6	2	3	1	2	0.086
7	3	1	3	2	0.069
8	3	2	1	3	0.075
9	3	3	2	1	0.092
$K_1$	2.10	2.10	2.23	2.35	
$K_2$	2.46	2.31	2.43	2.30	
$K_3$	2.36	2.55	2.26	2.27	
$k_1$	0.70	0.70	0.74	0.78	
$k_2$	0.82	0.74	0.81	0.77	
$k_3$	0.79	0.85	0.75	0.76	
R	0.12	0.15	0.07	0.02	
优水平	125 W	40 mL	70 ℃	20 min	

表3 DNJ提取方差分析

Tab.3 The analysis of variance for extract of the DNJ

差异源	SS	df	MS	F	显著性
A 功率	0.023 0	2	0.011 5	0.356 0	*
B 料液配比	0.095 5	2	0.047 6	1.473 7	**
C 温度	0.007 7	2	0.003 9	0.120 7	
D 时间	0.001 1	2	0.000 6	0.018 6	
误差	0.064 5	2	0.032 3		

注: \* 显著; \*\* 极显著

可看出,影响DNJ得率的因素主次顺序依次为料液配比、超声功率、提取温度和超声时间。较佳的工艺条件为  $B_3A_2C_2D_1$ ,即每克桑叶浸提剂用量40 mL,超声功率125 W,超声温度70 ℃,超声时间20 min。

## 2.6 优化工艺条件的验证

在物料粒径60目、每克桑叶浸提剂用量40 mL、超声功率125 W、温度70 ℃、超声时间20 min的条件下,按照优化工艺条件所得提取液中DNJ的得率为0.091%,固形物中的DNJ纯度为

27.2%。

### 3 结 语

1) 本实验中采用乙醇为浸提剂,超声波振荡为辅助,提取 DNJ 的得率为 0.091%,固形物中 DNJ 的纯度为 27.2%,比微波法<sup>[6]</sup>提取的 DNJ 得率高(微波法为 0.024%)。

2) 本实验中在使用紫外分光光度法检测 DNJ 含量时,采用 wagner 试剂显色,其原理是 DNJ 和

wagner 试剂反应生成棕红色络合物,在紫外条件下可检出。实验结果:标准曲线线性回归的回归方程为  $A=0.0918C-0.015$ ,  $R^2=0.9901$ ,表明在一定范围内, DNJ 的含量与吸光度具有一定线性关系。

3) 超声波强化法具有快速、简便、提取得率高、有效成分破坏较低的优点,在提取天然活性成分方面有广阔的应用前景。

### 参考文献(References):

- [1] 顾关云. 桑叶的化学成分和生物活性研究进展[J]. 国外医药·植物药分册, 2007, 22(1): 12-17.  
GU Guan-yun. Advance of chemical constituents and bioactivity of mulberry leaves[J]. *World Phytomedicines*, 2007, 22(1): 12-17. (in Chinese)
- [2] 江苏新医学院. 中药大辞典:下册[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1985.
- [3] 吴胜芳, 王树英, 汤坚. 桑叶的生物功能特性及其应用[J]. 食品科技, 2003(10): 95-97.  
WU Sheng-fang, WANG Shu-ying, TANG Jian. The functional properties and application of the mulberry leaves[J]. *Food Science and Technology*, 2003(10): 95-97. (in Chinese)
- [4] 杨雨, 欧阳臻, 常钰, 等. 桑叶不同组分降血糖作用研究[J]. 食品科学, 2007, 28(8): 454-456.  
YANG Yu, OUYANG Zhen, CHANG Yu, et al. Study on hypoglycemic effects of components in mulberry leaves[J]. *Food Science*, 2007, 28(8): 454-456. (in Chinese)
- [5] 罗存敏, 施新琴, 徐升胜. 桑叶提取物对小鼠血糖的影响及有效成分测定[J]. 蚕业科学, 2005, 31(4): 418-421.  
LUO Cun-min, SHI Xin-qin, XU Sheng-sheng. Effect of mulberry leaves extract on mice blood glucose level and the mensuration of its active components[J]. *Science of Sericulture*, 2005, 31(4): 418-421. (in Chinese)
- [6] 胡瑞军, 车振明. 微波萃取桑叶 1-脱氧野尻霉素工艺的研究[J]. 食品工程, 2008, 1(3): 50-53.  
HU Rui-jun, CHE Zhen-ming. Studies on the microwave-assisted extraction method of DNJ from mulberry leaves[J]. *Food Engineering*, 2008, 1(3): 50-53. (in Chinese)
- [7] 杨海霞. 桑叶中 DNJ 分离纯化及含量测定的研究[D]. 杭州:浙江大学, 2003.

(责任编辑:秦和平)