

· 中药工业 ·

响应曲面法优化桑白皮中3个成分的提取工艺[△]刘一涵¹, 田云刚¹, 王建霞¹, 郭洪伟¹, 魏华^{1,2*}

1. 吉首大学 生物资源与环境科学学院, 湖南 吉首 416000;

2. 湖南省土家医药研究中心, 湖南 吉首 416000

[摘要] 目的: 建立同时测定桑白皮中桑酮 G、桑酮 H 和桑辛素含量的高效液相色谱法, 采用响应曲面法对该 3 个成分的提取工艺进行优化。方法: 分别以桑酮 G、桑酮 H、桑辛素的提取含量作为响应值, 以乙醇体积分数、提取温度、提取时间为主要考察因素, 在单因素试验基础上采用中心组合设计试验, 确定 3 个成分的最佳提取工艺。结果: 同时提取桑白皮中桑酮 G、桑酮 H 和桑辛素的最佳工艺为乙醇体积分数 68%, 提取温度 74 ℃, 提取时间 110 min, 液料比 14:1, 该工艺桑酮 G 得率为 7.09 mg·g⁻¹, 桑酮 H 得率为 1.74 mg·g⁻¹, 桑辛素得率为 1.69 mg·g⁻¹, 与预测值相比, 相对误差分别为 0.30%、0.41%、0.42%。结论: 采用响应曲面法优化得到同时提取桑白皮中桑酮 G、桑酮 H、桑辛素的工艺科学合理, 可用于扩大生产。

[关键词] 桑白皮; 响应曲面法; 桑酮 G; 桑酮 H; 桑辛素; 高效液相色谱法

[中图分类号] R282.7; R284. **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2020)07-1100-08

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20190918005

Optimization of Extraction Technology of Three Components in Mori Cortex by Response Surface Methodology

LIU Yi-han¹, TIAN Yun-gang¹, WANG Jian-xia¹, GUO Hong-wei¹, WEI Hua^{1,2*}

1. College of Biology and Environmental Science, Jishou University, Jishou 416000, China;

2. Tujia Medicine Research Center in Hunan, Jishou 416000, China

[Abstract] **Objective:** To establish a high performance liquid chromatography method for simultaneous determination of kuwanon G, kuwanon H and morusin in Mori Cortex and optimize the extraction technology of them by response surface methodology. **Methods:** The contents of kuwanon G, kuwanon H and morusin were used as the response values, the ethanol concentration, extraction temperature and extraction time were taken as the main factors. Based on the single factor experiment, the central combination design experiment was used to optimize the best extraction technology for the three ingredients. **Results:** The optimum condition for extracting kuwanon G, kuwanon H and morusin from Mori Cortex was as follows: ethanol concentration 68%, extraction temperature 74 ℃, extraction time 110 min, ratio of material to liquid 14:1. The yield of kuwanon G was 7.09 mg·g⁻¹, the yield of kuwanon H was 1.74 mg·g⁻¹ and the yield of morusin was 1.69 mg·g⁻¹. Compared with the predicted values, the relative error was about 0.30%, 0.41%, 0.42%, respectively. **Conclusion:** The technology of extracting kuwanon G, kuwanon H and morusin from Mori Cortex obtained by response surface methodology is scientific and reasonable, and can be used to expand production.

[Keywords] Mori Cortex; response surface methodology; kuwanon G; kuwanon H; morusin; HPLC

桑白皮为桑科植物桑 *Morus alba* L. 的干燥根皮, 由秋末叶落时至次春发芽前采挖根部, 刮去黄棕色粗皮, 纵向剖开, 剥取根皮, 晒干后得^[1]。桑白皮是一种被广泛用于治疗咳嗽、肝炎、糖尿病、心脏

病及其他炎性疾病的传统药物^[2]。现代药理研究表明, 桑白皮具有抗炎、抗癌、降血脂、抗菌、抗糖尿病、胰脂肪酶抑制、神经保护、抗酪氨酸酶、抗氧化、抗抑郁等活性^[2,4]。桑白皮中主要含有

[△] **[基金项目]** 国家中医药行业科研专项(201507002); 国家自然科学基金青年科学基金项目(81403088); 湖南省土家医药研究中心开放项目(20172001); 吉首大学校级科研项目(Jdy1858)

* **[通信作者]** 魏华, 副教授, 研究方向: 天然药物化学成分; E-mail: weihua20@126.com

Diels-Alder型加合物、黄酮类、多羟基化生物碱、2-芳基苯并呋喃和二苯乙烯等成分^[4]。桑酮G、桑酮H、桑辛素为桑白皮中的3个主要活性成分。桑酮G对口腔病原体如变形链球菌、血链球菌、链球菌等具有明显的抑制作用^[3]；桑酮H具有抗人类免疫缺陷病毒(HIV)活性^[5]；桑辛素具有抗癌、抗炎、抗惊厥、神经保护、抗氧化和抗HIV等活性^[2]。桑酮G、桑酮H、桑辛素生物活性确切，但含量相对较少，其提取制备方法有待提高。为此，本研究采用响应曲面法中心组合设计试验，并结合HPLC测定含量，对桑白皮中的桑酮G、桑酮H、桑辛素进行提取工艺优化。与正交设计法相比，响应曲面法综合了试验设计与数学建模，可获得响应目标与试验因素之间明确的函数关系，从而获得较为精确的最佳工艺参数和响应目标的最优值^[6]。因此，本实验结果具有一定的参考价值和实用价值。

1 材料

1.1 仪器

WJX-800A高速多功能粉碎机(上海缘沃工贸有限公司)；LE204E天平(METTLER TOLEDO公司)；SHIMADZU高效液相色谱，配备Essentia LC-16二元泵、Essentia SIL-16自动进样器、Essentia SPD-16检测器、Essentia CTO-16柱温箱以及Labsolution工作站(岛津公司，中国)；R-210旋转蒸发器(BUCHI公司)；电热恒温水浴锅(北京市永光明医疗仪器有限公司)。

1.2 试药

桑酮G、桑酮H、桑辛素对照品为实验室自制，经HPLC检测，纯度分别为97%、98%、96%；乙腈(色谱纯，美国天地有限公司)；甲醇、无水乙醇、甲酸(分析纯，成都金山化学试剂有限公司)；水为怡宝纯净水。

桑白皮药材为市面购买，经吉首大学魏华副教授鉴定为桑科植物桑 *Morus alba* L. 的根皮。

2 方法与结果

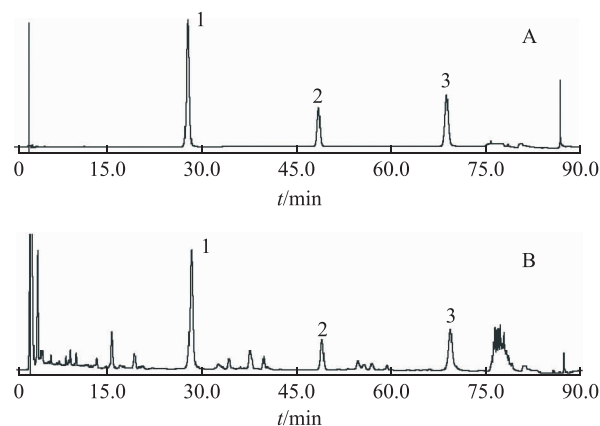
2.1 3个成分的含量测定

2.1.1 色谱条件 色谱柱：WondaCr act ODS-2柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)；流动相：0.2% 甲酸

(A)-乙腈(B)，梯度洗脱(0 ~ 27 min, 44% B；27 ~ 28 min, 44% ~ 50% B；28 ~ 47 min, 50% B，47 ~ 48 min, 50% ~ 55% B，48 ~ 70 min, 55% B，70 ~ 71 min, 55% ~ 100% B，70 ~ 81 min, 100% B，81 ~ 82 min, 100% ~ 44% B，82 ~ 90 min, 44% B)；流速：1.0 mL·min⁻¹；检测波长：265 nm；柱温：40℃；进样量：10 μL。

2.1.2 混合对照品的制备 精密称取桑酮H和桑辛素对照品7.2、4.7 mg，分别置于10 mL量瓶中，加甲醇定容，摇匀，配制成质量浓度分别为720、470 μg·mL⁻¹的桑酮H、桑辛素对照品母液。分别取4 mL桑酮H和5 mL桑辛素对照品母液于装有9.1 mg桑酮G对照品的25 mL量瓶中，加甲醇定容，摇匀，最终得桑酮G 364 μg·mL⁻¹、桑酮H 115.2 μg·mL⁻¹、桑辛素 94 μg·mL⁻¹的混合对照品。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称取药材粉末(过二号筛)0.500 g，置具塞锥形瓶中，精密加入不同浓度、不同体积的乙醇，回流提取，提取时间不同，提取温度不同，冷却后抽滤，滤液浓缩干后用80%甲醇定容至50 mL量瓶，充分摇匀，取适量过0.45 μm滤膜，即得供试品溶液。



注：A. 桑酮G、桑酮H和桑辛素的混合对照品；B. 桑白皮供试品溶液；1. 桑酮G；2. 桑酮H；3. 桑辛素。

图1 桑酮G、桑酮H和桑辛素的混合对照品及桑白皮供试品溶液的HPLC图

2.2 方法学考察

2.2.1 线性关系考察 精密吸取混合对照品溶液，加甲醇稀释成7个质量浓度的对照品溶液，在2.1.1项下条件进样测定。以各成分峰面积为纵坐标(Y)，各组份浓度(μg·mL⁻¹)为横坐标(X)绘制标准曲线，见表1。各成分在相应范围内线性关系良好。

表 1 桑白皮 3 个成分的线性回归方程、线性范围

对照品	回归方程	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	r
桑酮 G	$Y = 19\ 727X + 24\ 793$	9.1 ~ 364	0.999 9
桑酮 H	$Y = 19\ 396X + 1\ 436.4$	2.9 ~ 115.2	0.999 9
桑辛素	$Y = 39\ 318X - 3513$	2.35 ~ 94	0.999 9

2.2.2 仪器精密度 取同一浓度混合对照品溶液, 重复进样 6 次, 测得桑酮 G、桑酮 H、桑辛素峰面积的 RSD 分别为 0.25%、0.27%、0.26%, 保留时间的 RSD 分别为 0.53%、0.37%、0.27%, 表明仪器精密度良好。

2.2.3 方法精密度 日内精密度: 取同一浓度混合对照品溶液, 连续进样 6 次, 桑酮 G、桑酮 H、桑辛素峰面积的 RSD 分别为 0.25%、0.27%、0.26%, 保留时间的 RSD 分别为 0.53%、0.37%、0.27%, 表明日内精密的良好。

日间精密度: 取同一浓度混合对照品溶液, 重复进样 6 次, 进样 3 d, 测定桑酮 G、桑酮 H、桑辛素峰面积的 RSD 分别为 0.82%、1.07%、0.91%, 保留时间的 RSD 分别为 1.09%、0.66%、0.44%, 表明日间精密度良好。

2.2.4 重复性试验 取桑白皮药材 6 份, 按 2.1.3 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1.1 项下方法测定, 桑酮 G、桑酮 H、桑辛素峰面的 RSD 分别为 1.76%、2.37%、3.46%, 表明重复性良好。

2.2.5 稳定性试验 取同一供试品溶液, 室温下放置, 按 2.1.1 项下方法, 每隔 3 h 进一次样, 持续 24 h, 测得桑酮 G、桑酮 H、桑辛素峰面积的 RSD 分别为 0.74%、0.99%、0.76%, 保留时间的 RSD 分别为 1.11%、0.69%、0.48%, 表明供试品在 24 h 内稳定性良好。

2.2.6 加样回收率试验 取桑酮 G、桑酮 H、桑辛素对照品, 分别加甲醇稀释成质量浓度为 1.88、0.72、0.47 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。精密称定已知含量的桑白皮样品 0.250 g, 按所取样品中 3 个成分已知含量的 80%、100%、120%, 取上述各对照品溶液于锥形瓶中, 挥干甲醇后, 加入称取样品, 按 2.1.3 项下方法进行制备, 按 2.1.1 项下方法测定, 计算加样回收率。测定桑酮 G、桑酮 H、桑辛素的加样回收率, 结果见表 2。

表 2 桑白皮中桑酮 G、桑酮 H 和桑辛素的加样回收率试验结果 ($n = 3$)

化合物	样品中含 量/mg	加入量/ mg	测得量/ mg	平均回收 率/%	RSD/ %
桑酮 G	1.772 5	1.504 0	3.251 1	98.31	0.45
	1.772 5	1.880 0	3.594 5	96.91	0.12
	1.772 5	2.256 0	3.966 3	97.24	1.16
桑酮 H	0.435 0	0.360 0	0.791 6	99.06	0.82
	0.435 0	0.432 0	0.860 2	98.43	1.13
	0.435 0	0.504 0	0.936 6	99.53	0.25
桑辛素	0.422 5	0.329 0	0.746 6	98.52	0.64
	0.422 5	0.423 0	0.834 8	97.48	0.93
	0.422 5	0.517 0	0.941 0	100.29	1.16

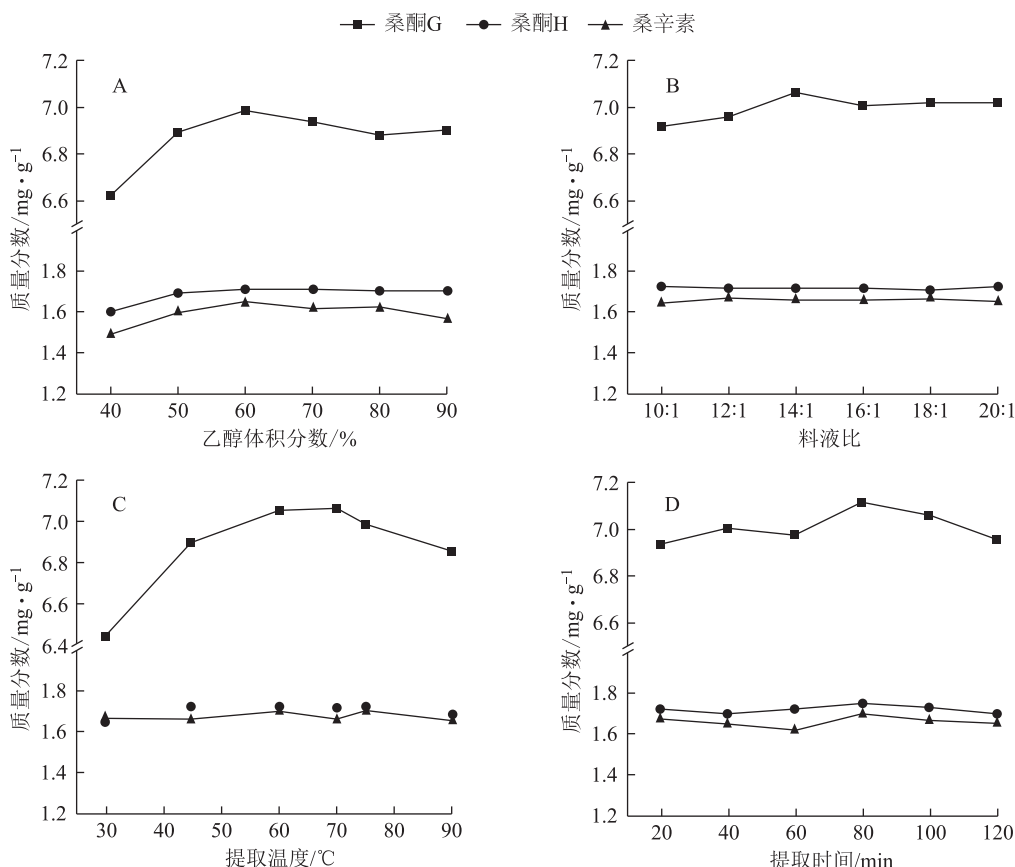
2.3 单因素试验

根据表 3, 分别改变提取溶剂的乙醇体积分数、溶剂体积、提取温度及提取时间进行单因素试验, 测定桑酮 G、桑酮 H、桑辛素的含量, 考察各因素的影响, 结果见图 2。

表 3 同步提取桑白皮中桑酮 G、桑酮 H 和桑辛素的单因素试验设计

水平	因素			
	乙醇体积分数/%	液料比	提取温度/℃	提取时间/min
1	40	10:1	30	20
2	50	12:1	45	40
3	60	14:1	60	60
4	70	16:1	70	80
5	80	18:1	75	100
6	90	20:1	90	120

结果显示, 随着乙醇体积分数增加, 桑酮 G、桑酮 H 和桑辛素含量逐渐上升, 在 60% 处均达到最大, 之后桑酮 G 和桑辛素含量呈缓慢下降趋势, 桑酮 H 基本趋于平缓; 液料比对桑酮 H 和桑辛素的提取含量影响均不明显, 随着液料比从 10:1 增加到 14:1, 桑酮 G 含量逐渐上升达到最大值, 在 14:1 以后, 桑酮 G 含量稍有下降, 后趋于平缓; 随着提取温度升高, 桑酮 G 含量明显增加, 桑酮 H 和桑辛素含量缓慢增加, 到 60 ℃ 达到最大, 后三者呈缓慢降低趋势; 在提取 80 min 时三者含量均达最大。



注: A. 乙醇体积分数对桑白皮中桑酮 G、桑酮 H、桑辛素提取量的影响; B. 液料比对桑白皮中桑酮 G、桑酮 H、桑辛素提取量的影响; C. 提取温度对桑白皮中桑酮 G、桑酮 H、桑辛素提取量的影响; D. 提取时间对桑白皮中桑酮 G、桑酮 H、桑辛素提取量的影响。

图2 各因素对桑酮 G、桑酮 H、桑辛素提取量的影响

2.4 响应曲面试验设计

2.4.1 试验因素与水平设计 根据单因素试验结果,综合考虑乙醇浓度、液料比、提取温度、提取时间对桑酮 G、桑酮 H、桑辛素含量的影响,选择以乙醇体积分数(A)、提取温度(B)和提取时间(C)为主要考察因素,自变量的高低水平用 1、0、-1 表示,分别以桑酮含量(Y_1)、桑酮 H 含量(Y_2)、桑辛素含量(Y_3)为响应值,试验因素及水平值见表 4。

表4 桑白皮提取工艺响应面试验因素及水平设计

水平	因素		
	A/%	B/℃	C/min
-1	40	30	40
0	60	60	80
1	80	90	120

2.4.2 响应面试验设计 采用 Design-Expert 8.0.6 软件,选择 Box-Behnken 法设计试验,按试验方案提取桑白皮样品,计算 3 个成分的含量,结果见表 5。

表5 桑白皮提取工艺响应面试验设计及结果

序号	A/%	B/℃	C/min	Y_1 桑酮 G/ mg·g ⁻¹	Y_2 桑酮 H/ mg·g ⁻¹	Y_3 桑辛素/ mg·g ⁻¹
1	60	60	80	7.01	1.73	1.63
2	80	60	120	7.02	1.73	1.67
3	60	60	80	7.11	1.76	1.69
4	80	90	80	6.90	1.70	1.65
5	80	30	80	6.48	1.65	1.62
6	60	60	80	6.99	1.73	1.62
7	60	60	80	7.01	1.73	1.60
8	40	30	80	5.98	1.53	1.40
9	40	90	80	6.97	1.70	1.56
10	40	60	40	6.83	1.66	1.48
11	60	30	120	6.50	1.67	1.57
12	60	90	120	7.03	1.74	1.67
13	60	30	40	6.22	1.62	1.59
14	60	90	40	6.94	1.72	1.64
15	40	60	120	6.76	1.62	1.46
16	80	60	40	6.88	1.70	1.64
17	60	60	80	7.04	1.73	1.62

2.4.3 响应曲面结果分析 利用 Design-Expert G、桑酮 H、桑辛素提取含量的回归模型, 见表 6, 8.0.6 软件对表 5 结果进行多元回归拟合, 得到桑酮 模型回归系数的显著性检验结果见表 7~9。

表 6 桑酮 G、桑酮 H 和桑辛素的回归方程

指标	回归方程
桑酮 G	$Y_1 = 7.03 + 0.093A + 0.33B + 0.054C - 0.14AB + 0.050AC - 0.047BC - 0.13A^2 - 0.32B^2 - 0.035C^2$
桑酮 H	$Y_2 = 1.74 + 0.033A + 0.048B + 6.132 \times 10^{-3}C - 0.029AB + 0.015AC - 8.075 \times 10^{-3}BC - 0.049A^2 - 0.039B^2 - 8.138 \times 10^{-3}C^2$
桑辛素	$Y_3 = 1.63 + 0.086A + 0.043B + 2.321 \times 10^{-3}C - 0.032AB + 0.014AC + 0.012BC - 0.063A^2 - 0.011B^2 - 6.185 \times 10^{-3}C^2$

表 7 桑酮 G 回归方程的方差分析结果

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	1.62	9	0.18	54.59	<0.000 1
A	0.069	1	0.069	21.04	0.002 5
B	0.88	1	0.88	267.79	<0.000 1
C	0.023	1	0.023	7.07	0.032 5
AB	0.079	1	0.079	23.97	0.001 8
AC	9.970×10^{-3}	1	9.970×10^{-3}	3.03	0.125 4
BC	9.001×10^{-3}	1	9.001×10^{-3}	2.73	0.142 2
A ²	0.066	1	0.066	20.12	0.002 8
B ²	0.44	1	0.44	134.89	<0.000 1
C ²	5.305×10^{-3}	1	5.305×10^{-3}	1.61	0.244 9
残差	0.023	7	3.292×10^{-3}		
失拟项	0.015	3	4.996×10^{-3}	2.48	0.200 5
纯误差	8.057×10^{-3}	4	2.014×10^{-3}		
总误差	1.64	16			

表 8 桑酮 H 回归方程的方差分析结果

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	0.050	9	5.577×10^{-3}	20.08	0.000 3
A	8.500×10^{-3}	1	8.500×10^{-3}	30.60	0.000 9
B	0.018	1	0.018	66.56	<0.000 1
C	3.009×10^{-4}	1	3.009×10^{-4}	1.08	0.332 6
AB	3.421×10^{-3}	1	3.421×10^{-3}	12.32	0.009 9
AC	8.644×10^{-4}	1	8.644×10^{-4}	3.11	0.121 1
BC	2.608×10^{-4}	1	2.608×10^{-4}	0.94	0.364 8
A ²	0.010	1	0.010	36.87	0.000 5
B ²	6.483×10^{-3}	1	6.483×10^{-3}	23.34	0.001 9
C ²	2.789×10^{-4}	1	2.789×10^{-4}	1.00	0.349 7
残差	1.944×10^{-3}	7	2.778×10^{-4}		
失拟项	1.336×10^{-3}	3	4.454×10^{-4}	2.93	0.163 1
纯误差	6.083×10^{-4}	4	1.521×10^{-4}		
总误差	0.052	16			

表9 桑辛素回归方程的方差分析结果

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	0.097	9	0.011	16.60	0.000 6
A	0.059	1	0.059	90.68	<0.000 1
B	0.015	1	0.015	22.39	0.002 1
C	4.309×10^{-5}	1	4.309×10^{-5}	0.066	0.804 1
AB	3.975×10^{-3}	1	3.975×10^{-3}	6.13	0.042 5
AC	7.821×10^{-4}	1	7.821×10^{-4}	1.21	0.308 6
BC	6.198×10^{-4}	1	6.198×10^{-4}	0.96	0.361 0
A ²	0.017	1	0.017	25.93	0.001 4
B ²	5.188×10^{-4}	1	5.188×10^{-4}	0.80	0.401 0
C ²	1.611×10^{-4}	1	1.611×10^{-4}	0.25	0.633 6
残差	4.543×10^{-3}	7	6.490×10^{-4}		
失拟项	4.568×10^{-4}	3	1.523×10^{-4}	0.15	0.925 1
纯误差	4.086×10^{-3}	4	1.021×10^{-3}		
总误差	0.100	16			

由表7~9方差分析可知,桑酮G、桑酮H、桑辛素提取的回归模型均 $P < 0.01$,失拟项 P 值(分别为0.200 5、0.163 1、0.925 1)均大于0.05,表明模型具有极显著性意义,可充分表示响应值(Y_1 、 Y_2 、 Y_3)与3个变量A、B、C的关系;3个模型的多元 r 分别为0.986 0、0.962 7、0.955 2,表明模型在所研究整个回归区域内拟合度较好,可用于桑白皮中桑酮G、桑酮H、桑辛素回流提取的含量预测。从表7可以看出,3个因素中,A和B对桑酮G提取含量影响极显著,C影响显著,其影响顺序为 $B > A > C$;交互项中AB交互作用影响极显著,二次项中 A^2 、 B^2 影响极显著。从表8可以看出,对桑酮H提取含量的影响,一次项A和B极显著,提取时间C不显著,影响的主次顺序为 $B > A > C$;AB交互作用影响极显著,二次项 A^2 、 B^2 影响极显著。从表9看出,A和B对桑辛素提取含量的影响极显著,提取时间C不显著,影响的主次顺序为 $A > B > C$;交互影响因素中AB交互作用极显著,二次项中 A^2 对桑辛素提取含量影响极显著。

由分析结果绘制出响应面3D图(图3~5),直观表现了3个因素交互作用对桑白皮中桑酮G、桑酮H、桑辛素的提取含量的影响。三维曲面图越陡峭,表示交互作用影响越明显,三维曲面越平滑,表示交互作用影响越小。分别比较图3~5中的3组三维响应图,可知乙醇浓度与提取温度交互作用对桑白皮中桑酮G、桑酮H、桑辛素的提取含量均最

为明显,而乙醇浓度与提取时间、提取温度与提取时间2组的交互作用对3个成分的提取含量均影响较小。这与表7~9的方差分析结果一致。

2.4.4 验证实验 采用软件优化功能,在Optimization→Numerical→Criteria下,点击Solutions分别选择单个优化项,软件自动根据各项模型方程计算得到各因素最大预测值,预测的桑酮G最佳提取条件:65.75%乙醇,液料比14:1,71.93℃提取107.81 min,提取质量分数为 $7.13 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$;桑酮H的最佳提取条件:64.75%乙醇,液料比14:1,74.66℃提取93.93 min,提取质量分数为 $1.75 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$;桑辛素的佳提取条件:69.14%乙醇,液料比14:1,100℃提取120 min,提取质量分数为 $1.70 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。在Solutions下同时选择3个优化项,软件可按照3个成分含量计算的综合加权评分拟合得到各因素最大值,最终得三者同时提取的最佳工艺:68.64%乙醇,液料比14:1,74.26℃提取110.45 min,提取质量分数分别为桑酮G $7.12 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,桑酮H $1.75 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,桑辛素 $1.68 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。因进行单个成分提取的含量结果与同时进行提取的含量预测结果相差不大,故选择同时提取3个成分。考虑到实施提取工艺的可操作性,将同时提取的最佳工艺参数修正为:68%乙醇,液料比14:1,74℃提取110 min。对该工艺进行3次重复验证,实际测得平均值分别为桑酮G $7.09 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、桑酮H $1.74 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 、桑辛素 $1.69 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,与预测值对比,相对误差分别约为0.30%、0.41%、

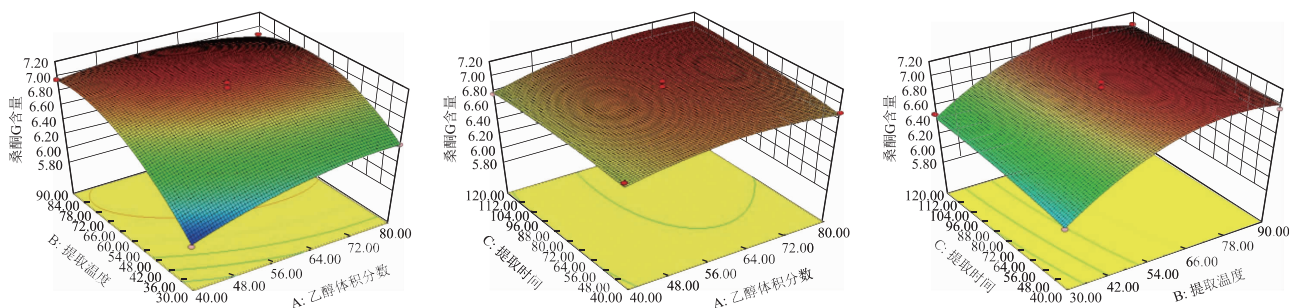


图 3 乙醇体积分数、提取温度、提取时间对桑白皮中桑酮 G 提取含量的交互影响图

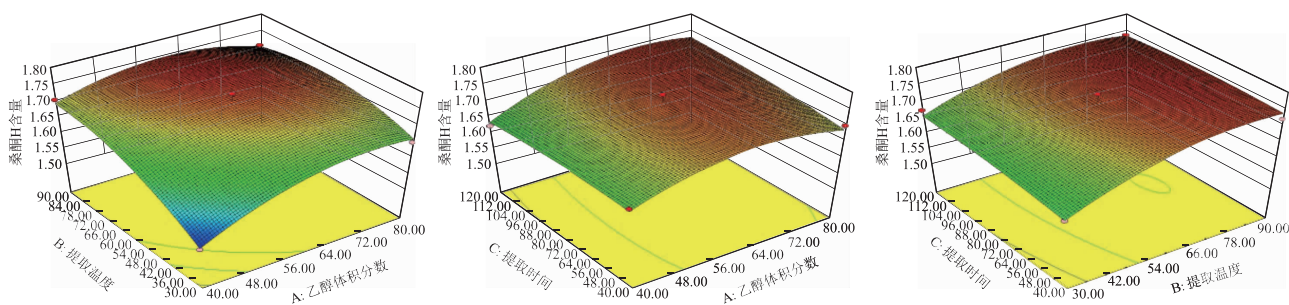


图 4 乙醇体积分数、提取温度、提取时间对桑白皮中桑酮 H 提取含量的交互影响图

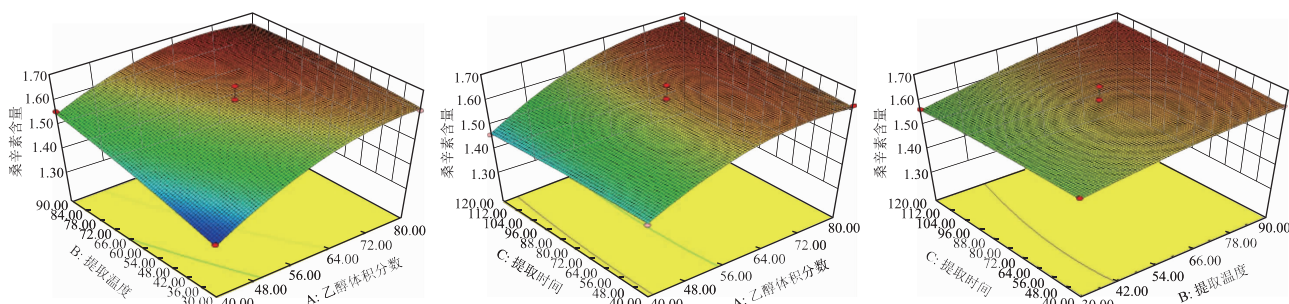


图 5 乙醇体积分数、提取温度、提取时间对桑白皮中桑辛素提取含量的交互影响

0.42%。说明本实验提供的回归模型对实际情况的拟合较为真实,证明采用响应面法对桑白皮中桑酮 G、桑酮 H、桑辛素的提取工艺进行优化,不仅科学实用,而且快速可靠。

3 讨论

试验前期对 HPLC 含量测定条件进行了选择,比较了甲醇-水、甲醇-0.01% 甲酸、乙腈-水、乙腈-0.01% 甲酸、乙腈-0.02% 甲酸 5 种流动相,结果发现,采用乙腈-0.02% 甲酸作为流动相梯度洗脱,3 种成分的分离度高,峰形良好,基线平稳;采用全波长对 3 种成分进行扫描,发现桑酮 G 和桑酮 H 最大吸收波长均为 263 nm,桑辛素最大吸收波长为 269 nm,最终选择以 265 nm

作为检测波长。

本试验对提取部位进行了筛选,发现 3 种成分在桑树不同部位中含量次序均为叶 < 枝 < 桑根白皮 < 桑根粗皮(桑根粗皮为桑根皮加工时刮下的外层栓皮,桑根白皮为刮去栓皮后的内层白皮)。市售桑白皮一般都会带有部分外层粗皮,本试验采用市售桑白皮作为试验材料。

本试验考察了提取方法、提取溶剂、溶剂浓度、液料比、提取温度、提取时间、提取次数 7 个因素,综合考虑毒性、试剂回收、提取效率及响应面法的变量要求等,选择以乙醇浓度、提取温度、提取时间作为考察因素,利用 Design-Expert 软件设计三因素三水平试验,通过数据分析及模型拟合,结合实际操作,最终确定同时提取桑白皮中桑

酮 G、桑酮 H、桑辛素的最佳工艺:乙醇体积分数 68%,液料比 14:1,提取温度 74 ℃,提取时间 110 min,该工艺桑酮 G 得率为 7.09 mg·g⁻¹,桑酮 H 得率为 1.74 mg·g⁻¹,桑辛素得率为 1.69 mg·g⁻¹。此外,本研究建立了同时测定桑白皮中桑酮 G、桑酮 H 和桑辛素的高效液相色谱法。本研究可为桑白皮的有效成分提取、质量控制及开发利用提供参考。

参考文献

- [1] 国家药典委员. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:280.
- [2] CHAN E W C, WONG S K, INOUE T, et al. Phenolic constituents from the root bark of *Morus alba* with emphasis on morusin and its anti-cancer properties[J]. J Chin Phar Sci, 2019, 28(2):7-19.
- [3] SHAHANA S, NIKALJE A P G. Phytochemistry and bioactivity of *Morus alba* (Mulberry) plant: A comprehensive review[J]. Asi J Pharm Pharmac, 2019, 5(2):207-217.
- [4] WEI H, ZHU J J, LIU X Q, et al. Review of bioactive compounds from root barks of *Morus* plants (Sang-Bai-Pi) and their pharmacological effects [J]. Cogent Chemistry, 2016, 2(1):1212320.
- [5] ZAFAR M S, MUHAMMAD F, JAVED I, et al. White mulberry (*Morus alba*): A brief phytochemical and pharmacological evaluations account[J]. Int J Agric Biol, 2013, 15(3):1560-8530.
- [6] 李莉, 张赛, 何强, 等. 响应面法在试验设计与优化中的应用[J]. 实验室研究与探索, 2015, 34(8):41-45.
- (收稿日期: 2019-09-18 编辑: 王笑辉)
-
- (上接第 1089 页)
- [12] CAI Z Q. Shade delayed flowering and decreased photosynthesis, growth and yield of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis*) plants[J]. Ind Crop Prod, 2011, 34(1):1235-1237.
- [13] ZHAO D Q, HAO Z J, TAO J. Effects of shade on plant growth and flower quality in the herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) [J]. Plant Physiol Bioch, 2012, 61:187-196.
- [14] 杨文权, 褚继鹏, 寇建村, 等. 遮阴对白三叶叶片解剖结构和光合特性的影响[J]. 草地学报, 2015, 23(3):653-656.
- [15] 姜玉娥. 玉米幼苗模拟遮阴处理转录组分析[D]. 泰安:山东农业大学, 2015.
- [16] ZHAO B, LI H T, LI J J, et al. *Brassica napus* DS-3, encoding a *DELLA* protein, negatively regulates stem elongation through gibberellin signaling pathway [J]. Theor Appl Genet, 2017, 130(4):727-741.
- [17] LI W J, ZHANG J X, SUN H Y, et al. *FveRGA1*, encoding a *DELLA* protein, negatively regulates runner production in *Fragaria vesca* [J]. Planta, 2018, 247(4):941-951.
- [18] JEONG S T, GOTO-YAMAMOTO N, KOBAYASHI S, et al. Effects of plant hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins [J]. Plant Sci, 2004, 167(2):247-252.
- [19] 王丰青, 智惊宇, 谢彩侠, 等. 地黄酪氨酸脱羧酶基因的克隆与表达分析[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(16):2981-2986.
- [20] WANG F Q, ZHI J Y, ZHANG Z Y, et al. Transcriptome analysis of salicylic acid treatment in *Rehmannia glutinosa* hairy roots using RNA-seq technique for identification of genes involved in acetoside biosynthesis [J]. Front Plant Sci, 2017(8):787.

(收稿日期: 2019-08-28 编辑: 戴玮)