

山梨酸苯丙氨酸乙酯的合成及抑菌活性

曾广翔¹, 陆惠邦¹, 孙胜玲², 宁正祥¹, 苏 兰¹, 韦庆益^{1*}

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510641;

2. 中国科学院广州地球化学研究所, 同位素地球化学国家重点实验室, 广东广州 510640)

摘要:以山梨酸、苯丙氨酸和乙醇为原料, 合成了山梨酸苯丙氨酸乙酯。通过单因素实验和正交实验, 探讨了反应时间、反应温度、苯丙氨酸和氯化亚砷的摩尔比对苯丙氨酸乙酯盐酸盐合成产率的影响, 并优化了工艺参数。合成苯丙氨酸乙酯盐酸盐最佳工艺条件为: 反应时间3.5h, 反应温度60℃, 苯丙氨酸和氯化亚砷的摩尔比1:3.2。抑菌实验结果表明, 山梨酸苯丙氨酸乙酯对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和牛奶酸败混合菌的最低抑菌浓度分别为2.50、0.75、2.00、2.50mmol/L, 其抑菌效果要优于山梨酸。在碱性条件下, 山梨酸苯丙氨酸乙酯依然具有较高的抑菌活性, 可把长牛奶酸败混合菌的生长适应期延长至36h。

关键词:山梨酸苯丙氨酸乙酯, 合成, 抑菌活性, 最低抑菌浓度

Synthesis and antibacterial activity of ethyl N-[1-oxo-2,4-hexadien-1-yl]-L-phenylalaninate

ZENG Guang-xiang¹, LU Hui-bang¹, SUN Sheng-ling², NING Zheng-xiang¹, SU Lan¹, WEI Qing-yi^{1*}

(1. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China;

2. State Key Laboratory of Isotope Geochemistry, Guangzhou Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract: A novel antibacterial agent, ethyl N-[1-oxo-2,4-hexadien-1-yl]-L-phenylalaninate was synthesized. Excellent synthetic yield were studied through optimization of the conditions, such as reaction time, temperature and the ratio of L-phenylalaninate and SOCl₂. When the reaction time was 3.5h, the reaction temperature was 60℃, the ratio of L-phenylalaninate and SOCl₂ was 1:3.2, the synthetic yield of L-phenylalaninate ethyl ester hydrochloride could reach 93.8%. The antimicrobial activity of ethyl N-[1-oxo-2,4-hexadien-1-yl]-L-phenylalaninate against *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* the mixed bacteria from rancidity milk was studied and its minimum inhibitory concentrations of ethyl N-[1-oxo-2,4-hexadien-1-yl]-L-phenylalaninate against these bacterial strains were 2.50, 0.75, 2.00 and 2.50mmol/L respectively. Its antibacterial activity was much better than sorbic acid. At the same time, ethyl N-[1-oxo-2,4-hexadien-1-yl]-L-phenylalaninate still exhibited good antibacterial activity in alkaline condition. The growth adaptation period of the mixed bacteria from rancidity milk could be prolonged to 36h.

Key words: ethyl N-[1-oxo-2,4-hexadien-1-yl]-L-phenylalaninate; synthesis; antibacterial activity; MIC

中图分类号: TS201.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2013)24-0321-05

食品是人类赖以生存的基本物质, 它提供给人类生活所需要的各种营养素和能量。通过消耗食品中的营养物质, 细菌、酵母和真菌等可以迅速繁殖, 从而导致食品发生微生物感染^[1]。随着生活水平的提高, 人们越来越注重食品的质量问题。因此, 增强食品的安全性是十分有必要的。利用合成的化学食品防腐剂来控制微生物的生长以及防止食品腐败, 是最常用的方法之一^[2]。目前, 国内常用的食品防腐剂按成分和来源不同, 主要分为酯型防腐剂、酸性防腐剂、生物防腐剂和无机防腐剂四类^[3-4]。食品防腐剂的构效研究表明: α 、 β -不饱和羰基结构是食品防腐剂

具有抗菌活性的有效功能性结构之一^[5]。本文以山梨酸、苯丙氨酸和乙醇为原料, 通过酰氯的方法对山梨酸进行改性, 合成具有广谱抑菌作用的化合物山梨酸苯丙氨酸丙酯。此药物有望作为新型的食品防腐剂, 也有望应用于化妆品、皮具、木材等领域的防霉抗菌, 具有广泛的应用前景。

1 材料与方法

1.1 材料及仪器

山梨酸 化学纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司; L-苯丙氨酸 含量 $\geq 98.0\%$, 上海伯奥生物科技有限公司; 乙醇 分析纯, 上海市凌峰化学试剂有限公司; 氯化亚砷 分析纯, 天津市光复精细化工研究所; 氢氧化钠、石油醚()、氯化钠、蔗糖、无水葡萄糖 分析纯, 广州化学试剂厂; 乙酸乙酯 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司; 硅胶粉 100~200

收稿日期: 2013-05-02 * 通讯联系人

作者简介: 曾广翔(1988-) 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品化学。

基金项目: 华南理工大学中央高校基本科研业务(2012ZM0070)。

目,上海谊恒工贸有限公司;牛肉膏、琼脂粉 广东环凯微生物科技有限公司;蛋白胨 北京奥博星生物技术有限责任公司;马铃薯 市售;营养肉汤培养基 用于大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、牛奶酸败混合菌的培养;马铃薯培养基 用于酿酒酵母和黑曲霉的培养^[6];枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、牛奶酸败混合菌、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*) 由华南理工大学轻工与食品学院提供。

AvanceIII 400核磁共振仪 瑞士布鲁克公司;DF-101S型集热式恒温加热磁力搅拌器 巩义市英浴高科仪器厂;RE-S2型旋转蒸发仪 上海亚荣生化仪器厂;SHZ-DC()型循环水式真空泵 巩义市予华仪器有限责任公司;S20型实验室pH计 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;YX-18LD型手提式压力蒸汽灭菌锅 江门滨江医疗设备有限公司;THZ-82A型水浴恒温振荡器 常州澳华仪器有限公司;721G型可见分光光度计 上海精密科学仪器有限公司;SPX-100B-Z型生化培养箱 上海博讯实业有限公司设备厂。

1.2 实验方法

1.2.1 山梨酸苯丙氨酸乙酯的合成 苯丙氨酸乙酯盐酸盐的合成:向装有低温温度计的100mL三口烧瓶中加入无水乙醇30mL。向其中加入一定比例的苯丙氨酸和氯化亚砷,冰盐浴中反应1h,再加热回流,直至固体完全消失。利用旋转蒸发仪减压除去剩余的乙醇及SOCl₂,得到中间体苯丙氨酸乙酯盐酸盐^[7-9]。

山梨酸的酰氯化反应:向100mL圆底烧瓶中加入摩尔比为1:3的山梨酸和氯化亚砷,在常温下搅拌反应1h。利用旋转蒸发仪减压除去剩余的SOCl₂,得到酰氯化后的山梨酸。

山梨酸苯丙氨酸乙酯的合成:向100mL圆底烧瓶中加入摩尔比为1:1的苯丙氨酸乙酯盐酸盐和酰氯化后的山梨酸,冰盐浴反应3h,室温反应4h。利用旋转蒸发仪减压除去低沸点物质,得到山梨酸苯丙氨酸乙酯粗品(图1)。合成山梨酸苯丙氨酸乙酯反应式如下:

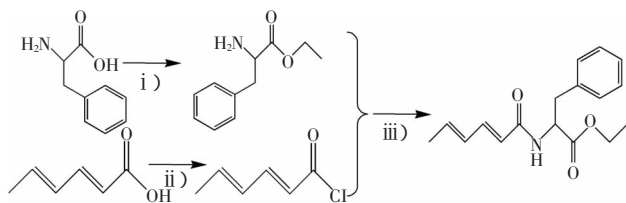


图1 山梨酸苯丙氨酸乙酯反应式

Fig.1 Synthesis of ethyl N-[1-oxo-2,4-hexadien-1-yl]-L-phenylalaninate

1.2.2 苯丙氨酸乙酯盐酸盐工艺参数优化实验

1.2.2.1 单因素实验 固定苯丙氨酸与氯化亚砷摩尔比1:3,反应温度60℃,考察反应时间分别为2、3、4、5、6h时对苯丙氨酸乙酯盐酸盐收率的影响。固定苯丙氨酸与氯化亚砷摩尔比1:3,反应时间4h,考察反应温度分别为50、60、70、80、90℃时对苯丙氨酸乙酯

盐酸盐收率的影响。固定反应时间4h,反应温度60℃,考察苯丙氨酸与氯化亚砷摩尔比分别为1:2.0、1:2.5、1:3.0、1:3.5和1:4.0时对苯丙氨酸乙酯盐酸盐收率的影响。

1.2.2.2 正交实验 为了优化反应条件和提高反应收率,在单因素条件实验的基础上,以苯丙氨酸乙酯盐酸盐的收率为考察指标,选择反应时间(A)、反应温度(B)和物料配比(C)为考察因素,以收率为考察指标,进行正交实验,其正交实验因素与水平见表1。

表1 正交实验因素与水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal test

水平	因素		
	A 反应时间(h)	B 反应温度(℃)	C 苯丙氨酸:氯化亚砷(mol/mol)
1	3.5	55	1:2.8
2	4.0	60	1:3.0
3	4.5	65	1:3.2

1.2.3 苯丙氨酸乙酯盐酸盐收率的计算 公式如下:

$$\text{收率}(\%) = \frac{\text{实际产率}}{\text{理论产率}} \times 100$$

1.2.4 产物的分离纯化 用乙酸乙酯对合成产物进行萃取,再用浓度为20g/L的NaOH溶液进行洗涤初步纯化,最后经层析柱(固定相为硅胶粉,流动相为石油醚:乙酸乙酯=2:1)进一步纯化后,得到纯品山梨酸苯丙氨酸乙酯。

1.2.5 最低抑菌浓度(MIC)测定 最低抑菌浓度的测定采用平板涂布法:将不同浓度的防腐剂溶液加入到已经灭菌的培养皿中,然后加入一定体积的培养基,充分混合以达到所需要的浓度。待培养基冷却后,加入等量的菌悬液0.1mL,用涂布器涂布均匀,置于37℃(细菌)培养24h,28℃(酵母)培养48h,28℃培养72h(霉菌)。观察菌体的生长情况,从无菌生长的培养皿中找出最低药物浓度的培养皿,此皿的药物浓度即为该药物的最低抑菌浓度^[10-11]。

1.2.6 微生物生长曲线测定 采用比浊法,100mL无菌营养肉汤液体培养基中,接入0.5mL牛奶酸败混合菌液,37℃恒温培养,测定不同培养时间样品在560nm波长下的吸光值A₅₆₀。以时间为横坐标,吸光值A₅₆₀为纵坐标,绘制微生物生长曲线^[12-13]。抑菌率按下式计算:

$$I(\%) = \frac{\Delta_i k - \Delta_i j}{\Delta_i k} \times 100$$

式中:Δ_{i k}和Δ_{i j}分别为空白与样品在t时刻A₅₆₀与接种时(t=0)A₅₆₀相比的增量^[14]。

1.2.7 核磁共振 以四甲基硅烷为内标物,其化学位移值为0,以氘代氯仿为溶剂,测定样品的¹H核磁共振谱。

2 结果与分析

2.1 单因素实验

2.1.1 反应时间对苯丙氨酸乙酯盐酸盐收率的影响 由图2可知,当反应时间为2h时,苯丙氨酸乙酯盐酸盐的收率只有40.7%。随着反应时间的增加,苯丙氨酸乙酯盐酸盐的收率也相应增大。当反应时间为4h时,

苯丙氨酸乙酯盐酸盐的收率达到最高,为89.4%。而继续增加反应时间,苯丙氨酸乙酯盐酸盐的收率略有下降,可能是由于时间过长导致副产物增多缘故。

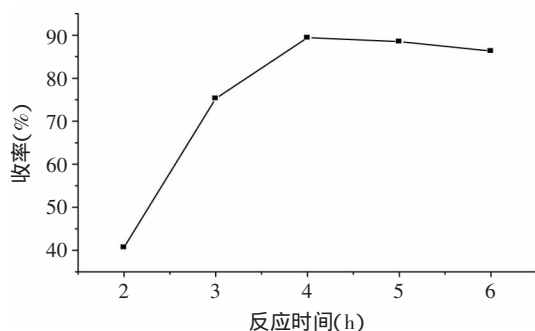


图2 反应时间对苯丙氨酸乙酯盐酸盐收率的影响

Fig.2 The effect of reaction time on the yield of L-Phenylalanine ethyl ester hydrochloride

2.1.2 反应温度对苯丙氨酸乙酯盐酸盐收率的影响

由图3可知,当反应温度低于60℃时,苯丙氨酸乙酯盐酸盐收率随着反应温度的增加而增加;当反应温度大于60℃时,苯丙氨酸乙酯盐酸盐收率随着反应温度的增加而略有降低,可能是由于温度过高导致氯化亚砷不断挥发,从而降低了氯化亚砷和乙醇分子碰撞的机会,进一步影响最终产率。

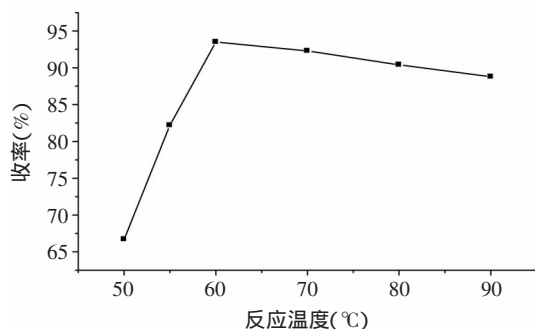


图3 反应温度对苯丙氨酸乙酯盐酸盐收率的影响

Fig.3 The effect of reaction temperature on the yield of L-Phenylalanine ethyl ester hydrochloride

2.1.3 苯丙氨酸与氯化亚砷的摩尔比对苯丙氨酸乙酯盐酸盐收率的影响 由图4可知,当苯丙氨酸与氯化亚砷的摩尔比为1:3时,苯丙氨酸乙酯盐酸盐收率较高。

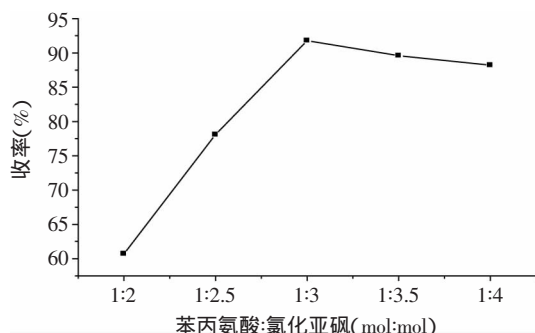


图4 物料比对苯丙氨酸乙酯盐酸盐收率的影响

Fig.4 The effect of material ratio on the yield of L-Phenylalanine ethyl ester hydrochloride

继续增加氯化亚砷用量,苯丙氨酸乙酯盐酸盐收率反而下降。这是因为氯化亚砷极易挥发,部分过量有利于反应进行,但当氯化亚砷的量增加到一定程度时,便加大了氯化亚砷双键聚合的可能性,导致收率下降。

2.2 苯丙氨酸乙酯盐酸盐正交实验

苯丙氨酸乙酯盐酸盐正交实验结果如表2所示。从表2极差R的大小可以看出,影响苯丙氨酸乙酯盐酸盐收率的因素大小依次为:B>C>A,即主次顺序依次为:反应温度、物料配比、反应时间。由k值可得合成苯丙氨酸乙酯盐酸盐的工艺条件为A₁B₂C₃,即反应时间3.5h、反应温度60℃、苯丙氨酸与氯化亚砷的摩尔比1:3.2。验证实验表明,此条件下苯丙氨酸乙酯盐酸盐的收率为93.8%。

表2 正交实验设计与结果

Table 2 Design and results of orthogonal test

实验号	A	B	C	收率(%)
1	1	1	1	78.3
2	1	2	2	90.4
3	1	3	3	88.5
4	2	1	2	80.8
5	2	2	3	93.2
6	2	3	1	79.5
7	3	1	3	80.6
8	3	2	1	81.2
9	3	3	2	88.9
k ₁	85.7	79.9	79.7	
k ₂	84.5	88.2	86.7	
k ₃	83.6	85.6	87.4	
R	2.1	8.3	7.7	

2.3 产物表征

产品为浅黄色固体,熔点69.8~72.2℃。其¹H NMR谱数据如表3所示,¹H NMR可提供化学位移、峰面积积分值、自旋分裂数和耦合常数几方面的数据,根据这些数据可对产物的结构进行鉴定。从表3可以看出,氢原子总数为21个,与山梨酸苯丙氨酸乙酯分子

表3 山梨酸苯丙氨酸乙酯的¹H NMR谱数据

Table 3 ¹H NMR data of ethyl N-[1-oxo-2,4-hexadien-1-yl]-L-phenylalaninate

化学位移值	峰分裂数	氢原子个数	氢原子位置
δ ₁ =7.29-7.27	多重峰	1	CH=C-C=O
δ ₂ =7.26-7.08	多重峰	5	C ₆ H ₅ -C
δ ₃ =6.15	单峰	1	NH
δ ₄ =6.18-6.06	多重峰	1	C=C-CH-C
δ ₅ =5.97	双重峰	1	C-CH=C-C
δ ₆ =5.77	双重峰	1	C=CH-C=O
δ ₇ =4.95	四重峰	1	Ph-C-CH
δ ₈ =4.16	四重峰	2	OCH ₂
δ ₉ =3.16	多重峰	2	CH ₂ -Ph
δ ₁₀ =1.85	双重峰	3	CH ₃ -C=C
δ ₁₁ =1.24	三重峰	3	O-C-CH ₃

式的氢原子数一致。另外, H的化学位移值与氢原子所在官能团的位置呈一一对应关系, 其与山梨酸苯丙氨酸乙酯结构式的氢原子位置一致。因此, 可确定产物为山梨酸苯丙氨酸乙酯。

2.4 最低抑菌浓度测定

由表4可知, 山梨酸苯丙氨酸乙酯对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和牛奶酸败混合菌的最低抑菌浓度分别为2.50、0.75、2.00、2.50mmol/L, 与山梨酸抑菌效果相当, 其中对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌抑菌效果优于山梨酸。表明山梨酸苯丙氨酸乙酯对食品常见污染菌具有较强的抑菌活性。而山梨酸对酿酒酵母和黑曲霉的最低抑菌浓度分别为4.50mmol/L和4.00mmol/L, 比山梨酸苯丙氨酸乙酯的抑菌效果要好。

表4 山梨酸苯丙氨酸乙酯对供试菌的最低抑菌浓度(mmol/L)

Table 4 Antimicrobial activity of ethyl N-[1-oxo-2-*A*-hexadien-1-yl]-L-phenylalaninate against the selected microorganisms determined as the minimal inhibitory concentration(MIC, in mmol/L)

供试菌	山梨酸苯丙氨酸乙酯	山梨酸
大肠杆菌	2.50	2.50
枯草芽孢杆菌	0.75	2.25
金黄色葡萄球菌	2.00	2.50
牛奶酸败混合菌	2.50	2.50
酿酒酵母	>5.25	4.50
黑曲霉	>5.25	4.00

2.5 山梨酸苯丙氨酸乙酯对牛奶酸败混合菌的生长抑制作用

实验中, 山梨酸苯丙氨酸乙酯和山梨酸的添加量都为2.5mmol/L。由图5可以看出, 在pH等于7的中性条件下, 空白对照组中牛奶酸败混合菌快速生长繁殖, 当时间为12h时, 菌液的OD_{560nm}值便达到了0.984。而山梨酸和山梨酸苯丙氨酸乙酯的细菌生长适应期均延长至了24h, 抑菌率达到90%以上, 表明山梨酸和山梨酸苯丙氨酸乙酯具有明显的抑菌作用。在pH等于5的酸性条件下, 山梨酸表现出较好的抑菌效果, 其48h内菌液的OD_{560nm}值在0.1以下。山梨酸苯丙氨酸乙酯的抑菌效果则与在中性条件下的抑菌效果相当, 24h内可显著抑制细菌的生长。在pH等于9的碱性条件下, 山梨酸苯丙氨酸乙酯依然具有较好的抑菌活性, 使得牛奶酸败混合菌的适应期延长至36h。但山梨酸在pH等于9的碱性条件下, 当时间为18h, 抑菌率在10%以下, 表明其几乎完全失去了抑菌活性。

综上所述, 山梨酸虽然具有较强的抑菌效果, 但仅在酸性条件下得以发挥其作用。在中性条件下, 山梨酸的抑菌效果则大大降低。而在碱性条件下, 山梨酸几乎没有任何抑菌活性, 可能是由于反应生成盐后改变了其性质的缘故。山梨酸苯丙氨酸乙酯的抑菌效果受体系pH影响较小, 在不同的pH条件下依然可以保持较强的抑菌活性。

3 结论

3.1 以山梨酸、苯丙氨酸和乙醇为原料, 通过酰氯

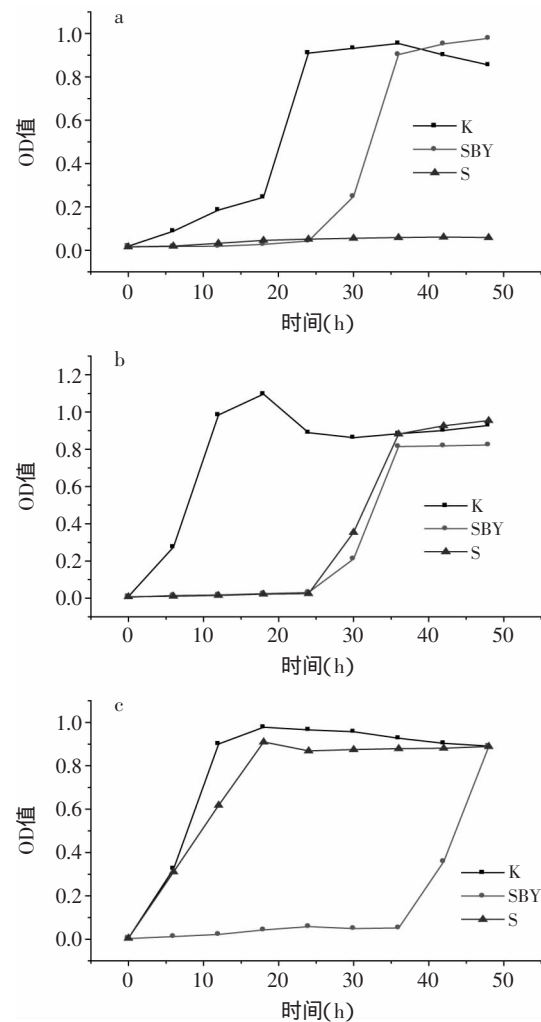


图5 山梨酸苯丙氨酸乙酯对牛奶酸败混合菌的生长抑制作用

Fig.5 The growth inhibition effect on the mixed bacteria from rancidity milk of ethyl N-[1-oxo-2-*A*-hexadien-1-yl]-L-phenylalaninate

注: K-空白; SBY-山梨酸苯丙氨酸乙酯; S-山梨酸; a: pH5; b: pH7; c: pH9。

反应, 可以较高效率地合成山梨酸苯丙氨酸乙酯。合成苯丙氨酸乙酯盐酸盐最佳工艺条件为: 反应时间3.5h, 反应温度60℃, 苯丙氨酸和氯化亚砷的摩尔比1:3.2, 此时收率可达93.8%。

3.2 山梨酸苯丙氨酸乙酯对肠杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和牛奶酸败混合菌的最低抑菌浓度分别为2.50、0.75、2.00、2.50mmol/L, 其抑菌效果要优于防腐剂山梨酸。

3.3 山梨酸苯丙氨酸乙酯在不同的pH体系均具有较强的抑菌活性, 有望作为新型防腐剂应用于食品、化妆品领域。

参考文献

- [1] Zanatta N, Borchhardt D M, Alve S H, et al. Synthesis and antimicrobial activity of new(4-*A*-trihalo-3-oxo-but-1-enyl)-carbamic acid ethyl esters, γ -(4-*A*-trihalo-3-hydroxy-butyl)-carbamic acid ethyl esters and 2-oxo-6-trihalomethyl-[1,3]

oxazinane-3-carboxylic acid ethyl esters[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2006, 14: 3174-3184.

[2] Wei Q Y, Xiong J J, Jiang H *et al.* The antimicrobial activities of the cinnamaldehyde adducts with amino acids[J]. *International Journal of Food Microbiology* 2011, 150: 164-170.

[3] 林科. 食品防腐剂的种类及其研究进展[J]. *广西轻工业*, 2009(10): 9-11.

[4] 罗傲霜, 淳泽, 范益军, 等. 食品防腐剂的概况与发展[J]. *中国食品添加剂* 2005(4): 55-59.

[5] 宁正祥, 谭龙飞, 张德聪, 等. α - β -不饱和羰基化合物的分子结构特性与抗菌活性间的关系[J]. *应用化学*, 1996, 13(1): 38-42.

[6] 黄文芳, 张松. *微生物学实验指导*[M]. 广州: 暨南大学出版社, 2003.

[7] Orlandi M, Rindone B, Molteni G *et al.* Asymmetric biomimetic oxidations of phenols: the mechanism of the diastereo- and enantioselective synthesis of dehydronicoferyl ferulate (DDF) and dehydronicoferyl alcohol (DDA)[J]. *Tetrahedron* 2011, 57: 371-378.

[8] 马冰洁, 杨妍, 唐洪波, 等. 反丁烯二酸单甲酯单酰氯的合成及催化性能[J]. *精细化工中间体* 2010, 40(3): 50-53.

[9] 曲大伟. 芳香酰氯的合成方法[J]. *化工中间体* 2007(9): 18-20.

[10] Smith A, Nobmann P, Henahan G, *et al.* Synthesis and antimicrobial evaluation of carbohydrate and polyhydroxylated non-carbohydrate fatty acid ester and ether derivatives[J]. *Carbohydrate Research* 2008, 343: 2557-2566.

[11] Yesilel O Z, Mutlu A, Darcan C *et al.* Syntheses, structural characterization and antimicrobial activities of novel cobalt-pyrazine-2,3-dicarboxylate complexes with N-donor ligands[J]. *Journal of Molecular Structure* 2010, 964: 39-46.

[12] 陈红梅, 未本美, 张智勇. 富马酸葡萄糖乙酯的合成及抑菌效果研究[J]. *食品科技* 2009, 34(7): 214-216.

[13] 吴亚凉, 宁正祥. 反丁烯二酸-6-L-抗坏血酸甲酯的合成及抑菌性能的研究[J]. *食品与发酵工业* 2009, 135(9): 58-62.

[14] 王序婷, 张庆, 黄文. 新型食品防腐剂富马酸纤维二糖甲酯的抗菌特性研究[J]. *食品科技* 2011, 36(4): 215-218.

(上接第308页)

放内容物,并促进溶剂进入提取物细胞,加速成分进入溶剂,可大大缩短萃取时间和提高萃取率^[11],因此本实验采用超声波辅助的乙醇溶剂提取法提取桑叶总生物碱。

桑叶中总生物碱的含量测定方法主要有:重量沉淀法^[12]、紫外分光光度法^[13]、高效液相色谱法(HPLC)^[14]和液相色谱-质谱联用法(LC-MS)^[15]等。紫外分光光度法所需的蒸发光散射检测器、示差折光检测器等虽然灵敏度高结果较准确可靠,但其价格昂贵,不利于大面积应用普及^[16]。何军等^[17]比较了紫外分光光度法和重量沉淀法在测定附子总生物碱含量中的差异,发现重量沉淀法准确性、稳定性要优于紫外分光光度法。因此,本实验采用经典的重量沉淀法,具有不需要使用昂贵的对照品(如DNJ)、操作简单、快捷等优点。为排除非生物碱成分(多糖、多肽、蛋白质等)对本检测方法准确性的影响,将浓缩的样品液加入90%乙醇,结果未见多糖结晶析出。并且供试液在3h内稳定,重现性良好,可作为新疆药桑桑叶总生物碱含量测定的方法。

本实验采用正交实验优化新疆药桑桑叶总生物碱的最佳提取工艺,在最佳实验条件:提取时间20min,提取温度60℃,料液比1:20,超声功率800W,乙醇浓度60%,得到总生物碱含量为4.64mg·g⁻¹。结果表明利用超声波辅助的乙醇溶剂提取法提取新疆药桑桑叶总生物碱具有省时、高效、节能的优点。

参考文献

[1] 卢红,丁天龙,吴曙光,等. 新疆药桑的药用价值及在维吾尔医药中的应用[J]. *蚕业科学* 2011, 37(6): 1098-1101.

[2] 邹盛勤,陈武. 桑叶的化学成分、药理活性及应用研究进展[J]. *林业化工通讯* 2003, 37(1): 22-25.

[3] NIWA T, INOUE S, TSURUOKA T *et al.* "Nojirimycin" as a potent inhibitor of glucosidase[J]. *Agric Biol Chem* 34(6):

966-971.

[4] Asano N, H Kizu. N-alkylated nitrogen in the ring sugars: conformational basis of inhibition of glycosidases and HIV-1 replication[J]. *J Med Chem* 1995, 38(13): 2349-2356.

[5] Kong H W, S H Ohet. Antiobesity effects and improvement of insulin sensitivity by 1-Deoxynojirimycin in animal models[J]. *J Agric Food Chem* 2008, 56: 2613-2619.

[6] 买买提依明. 新疆药桑的研究[J]. *北方蚕业* 2007, 28(1): 1-3.

[7] 宋大可, 买买提依明. 新疆药桑果汁化学成分及药物价值研究[J]. *蚕桑通报* 1994, 25(4): 34.

[8] 邓海波. 桑叶降血糖有效成分及黄酮类化合物的研究[D]. 南宁: 广西师范大学, 2005: 14-15.

[9] 肖崇厚. *中药化学*[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1997: 93-94.

[10] 邓伟杰, 孙智平, 罗新根, 等. 正交实验设计优化桑叶总生物碱提取工艺[J]. *中华中医药学刊* 2012, 30(3): 608-609.

[11] 曾里. 超声波和微波对中药提取的促进和影响[J]. *化学研究与应用* 2002, 14(3): 245-249.

[12] 李萍, 曾令杰, 李松林. 无紫外吸收的贝母总生物碱含量分析方法研究[J]. *中国药学杂志* 2002, 37(8): 614-617.

[13] 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.

[14] 欧阳华学, 黎源倩, 肖全伟. HPLC法测定桑叶中1-脱氧野尻霉素[J]. *中草药* 2007, 38(5): 774-776.

[15] Nuengchamnon N, K Ingkaninan. Quantitative determination of 1-deoxynojirimycin in mulberry leaves using liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. *J Phar Biom*, 2007, 44: 853-858.

[16] Kimura T, K Nakagawa. Simple and rapid determination of 1-deoxynojirimycin in mulberry leaves[J]. *Bio Factors* 2004, 22: 341-345.

[17] 何军, 祝林, 秦建芳. 附子总生物碱含量测定方法比较[J]. *现代中药研究与实践* 2003, 17(6): 20-22.