

桑叶提取物泡腾片制备工艺及其抗氧化活性研究^①

李冠楠¹, 夏雪娟², 赵欢欢¹, 吴雪莹²,
杨蕊莲², 衡志杰¹, 杨成飞¹, 朱勇¹

1. 西南大学 生物技术学院, 重庆 400715; 2. 西南大学 食品科学学院, 重庆 400715

摘要: 以桑叶为原料, 对桑叶提取物泡腾片的制备工艺及其体外抗氧化活性进行了研究。采取超声波辅助乙醇萃取法提取桑叶功能性成分, 添加 0.15 g/mL 麦芽糊精, 真空冷冻干燥 9 h 后粉碎过 180 μm 筛, 得到桑叶提取物冻干粉。桑叶提取物泡腾片宜采用湿法制粒, 配方为桑叶提取物冻干粉 5%, 柠檬酸 12%, 碳酸氢钠 7.5%, 甘露醇 7%, 葡萄糖 30%, 蔗糖 38.5%。桑叶提取物泡腾片对羟自由基, DPPH 自由基和超氧阴离子自由基的半数清除率(IC_{50})分别为 49.78, 77.12 和 94.98 mg/mL。

关 键 词: 桑叶; 泡腾片; 干燥; 配方; 制备工艺; 抗氧化

中图分类号: TS201.1

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2015)04-0132-06

桑叶是桑科植物桑 *Morus alba* L. 的叶子, 富含黄酮类^[1]、生物碱类^[2]、多糖类^[3]等多种生物活性物质, 具有降“三高”、减肥、抗衰老、美白、养颜、护肤等功效^[4], 被卫生部推荐为药食两用食物^[5]。我国桑叶年产量巨大, 但绝大部分被废弃, 几乎没有得到有效的利用。

泡腾片的特别之处在于它还含有泡腾崩解剂, 当泡腾片放入饮水中之后, 在泡腾崩解剂的作用下, 即刻产生大量气泡(二氧化碳), 使片剂迅速崩解和融化, 产生的二氧化碳部分溶解于饮水中, 使饮水喝入口中时有汽水般的美感。具有服用方便、易吸收、口感好、便于保存和携带等优点, 特别适用于儿童和老年人^[6]。泡腾片剂在医药上使用较早, 在 20 世纪 70 年代, 国外已有药用泡腾片上市。而在食品上的使用才刚刚开始, 主要是固体饮料, 目前已经有含茶、果蔬、微量营养素等的泡腾片^[7]。

目前国内外有关桑叶产品开发的研究多集中在桑叶茶、桑叶粉、桑叶饮料等, 如 Pothinuch 等^[8]研究了 *Morus* spp. 桑叶的样品制备、栽培、叶龄和加工方式对桑叶茶中褪黑激素含量的影响。张颖等^[9]研究了桑叶醇提物与绿茶复配, 调制了具有桑叶和绿茶特有香气的桑叶绿茶复合饮料。Srivastava 等^[10]将桑叶粉与面粉混合用以制作印度常见的一种食物 Paratha。刘树兴等研制出了桑叶饮料^[11]。但用桑叶提取物制备泡腾片的研究还鲜有报道。本研究拟研制的桑叶提取物泡腾片是由桑叶提取物经冷冻干燥后制成的发泡型固体饮料, 不仅具有绿色安全、携带方便、易于吸收, 兼有固体制剂和液体制剂的特点, 还具有抗氧化活性, 为桑叶资源的再利用提供了一个可能的方向。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

桑叶(嘉陵 20 号), 西南大学生物技术学院桑树资源及育种研究室; 柠檬酸、碳酸氢钠、甘露醇、葡萄

① 收稿日期: 2013-12-02

基金项目: 国家农业科技成果转化资金(2012GB2F100376)。

作者简介: 李冠楠(1985-), 男, 上海人, 博士研究生, 主要从事家蚕遗产育种的研究。

通信作者: 朱勇, 教授, 博士研究生导师。

糖、蔗糖、麦芽糊精(DE: 9~12)，药用级；聚乙二醇6000、聚乙烯吡咯烷酮K30(分析纯)，上海维酮材料科技有限公司；1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)，美国sigma公司；清除羟自由基试剂盒、清除超氧阴离子自由基试剂盒，南京建成生物工程有限公司；其余为实验室常规试剂。

1.2 仪器与设备

ZP01-III单冲压片机，泰州市黎明制药机械有限公司；Alpha 1-4 LSC冷冻干燥机，德国Christ公司；KQ3200DB型数控超声波清洗器，昆山市超声仪器有限公司；DHG-9240电热恒温鼓风干燥箱，上海齐欣科学仪器有限公司；旋转蒸发器RE-5298，上海亚荣生化仪器厂；不锈钢标准筛，浙江上虞市肖金筛具厂；手提式DFT-200A高速万能粉碎机，上海比朗仪器有限公司；TA-XT2i物性测定仪，英国Stable Micro System公司；DSH20-1多功能红外水分仪，上海隆拓仪器设备有限公司；UV-2450型紫外可见分光光度计，日本岛津制作所。其余为实验室常用设备。

1.3 方法

1.3.1 桑叶提取物的制备

1.3.1.1 桑叶活性物质的提取^[3,12]

将桑叶洗净，自然晒干，粉碎，过250 μm筛。向2000 mL大烧杯中加入900 mL无水乙醇，600 mL纯水，用柠檬酸调pH至3.6后添加150 g桑叶粉末。将烧杯放入100 W超声波清洗器中，80 °C萃取2 h。萃取结束后用4层纱布将溶液过滤至2000 mL圆底烧瓶中，75 °C旋转蒸发至10~20 mL。滤渣另添加1000 mL 60%乙醇，重复萃取1次，合并2次萃取物并定容至50 mL，-18 °C冻存备用。

1.3.1.2 桑叶活性物质的干燥

提取物中富含多糖^[3]，冷冻干燥后易结块，很难研磨至粉末状。而麦芽糊精可防结块、增加分散性和溶解性，且可降低溶液冰点^[13]，增加冷冻干燥效率，故考虑加入一定量的麦芽糊精。分别加入0.10, 0.15, 0.20 g/mL的麦芽糊精，测定不同干燥时间(5, 7, 9, 11 h)下提取物的含水量，以确定最佳麦芽糊精用量和最佳干燥时间。

1.3.2 泡腾片配方研究

1.3.2.1 崩解剂选择

本实验选取碳酸氢钠与柠檬酸作为崩解剂。柠檬酸易溶于水、口感好，是目前应用最广泛的泡腾剂酸源，与蔗糖合用可防蔗糖晶析，具有很强的吸湿性，在生产和贮藏过程中要注意防潮^[14]。因柠檬酸与碳酸氢钠完全反应时比例为0.76:1或0.6:1^[15]。试验中还须柠檬酸呈现酸味，故酸的量应大于化学反应理论量。

1.3.2.2 甜味剂选择

试验对葡萄糖、柠檬粉、苹果粉、蔗糖、乳糖、甘露醇等甜味剂进行了研究。因柠檬粉会增强溶液的酸味，苹果粉影响溶液的颜色，故排除。乳糖甜味过淡，故采用葡萄糖、蔗糖、甘露醇混合调味，其比例为1:4.3:5.5。

1.3.2.3 桑粉及崩解剂配比选择

在确定各辅料并对桑粉、酸、碱进行单因素试验后，对桑粉、酸和碱与泡腾片总质量的百分比进行正交实验确定泡腾片配方，见表1。随机挑选10名不同消费群体的志愿者，由志愿者审评各配方感官品质^[16]。感官评定指标包括溶解性、口感、泡沫量、汤色4个方面，见表2，每组样品重复3次。其中各项指标以5分表示最佳，0分表示最差，综合指标为各指标之和。以感官评价结果为指标采用L₉(3⁴)正交试验进行研究。

表1 正交设计因素水平

水 平	A		B		C	
	桑粉/%		酸/%		碱/%	
1	3		8		6	
2	5		12		8	
3	7		16		10	

表2 正交试验评定标准^[17]

指标	1分	2分	3分	4分	5分
溶解性	很短(长)	较短(长)	短(长)	微短(长)	合适
口感	很苦、涩	较苦、涩	微酸、微苦涩	微酸、微甜	酸甜
泡沫量	很多(少)	较多(少)	多(少)	微多(少)	合适
汤色	深黄绿	/	浅黄绿	/	黄绿

1.3.3 泡腾片的制备

1.3.3.1 泡腾片的压片工艺

因干法制粒压片法、直接粉末压片法易花片^[18], 故本试验采取湿法制粒。为保证崩解剂的稳定性, 采取聚乙二醇包裹法; 为使片剂颜色均匀, 将桑叶提取物同时添加于酸粒、碱粒中; 为防止黏冲及出片困难等问题, 在压片前要加一定量的润滑剂^[19]。试验选择聚乙二醇 6000(PEG 6000)为润滑剂, 其与碱的比例为 8:15; 聚乙烯吡咯烷酮 K30 为粘合剂, 用量为 2%。具体工艺流程: 桑叶提取物、柠檬酸、甜味剂、粘合剂→过 180 μm 筛→加无水乙醇→制软材→850 μm 筛制粒→60 ℃烘约 40 min→850 μm 筛整粒→烘干→酸粒; 桑叶提取物、碳酸氢钠→过 180 μm 筛→润滑剂→碱粒+酸粒→压片→桑叶提取物泡腾片。

1.3.3.2 泡腾片质量检查^[20]

片剂外观光洁度、色泽均匀度采用感官评定法。硬度、碎脆度采用仪器测定法。

片质量差异的测定方法: 取药片 20 片, 精密称定总质量、求得平均片质量后, 再分别精密称定各片的质量。每片质量与平均质量相比较, 超出质量差异限度(平均质量 0.30 g 以上, 质量差异限度±5%)的药片不得多于 2 片, 并不得有 1 片超出限度 1 倍。

崩解时限的测定方法: 取 1 片泡腾片, 置于盛有 200 mL 水的 250 mL 烧杯中, 水温为 15~20 ℃。当片剂或碎片周围的气体停止溢出时, 片剂应崩解、溶解或分散在水中, 无聚集的颗粒剩留。按上述方法检查 6 片, 各片均应在 5 min 内崩解。

1.3.4 泡腾片体外抗氧化活性的测定^[21~22]

参照 Chang 等^[23]的方法, 将泡腾片用水溶解, 配成一系列浓度(0, 12.5, 25, 50, 100 mg/mL)的溶液, 各取 0.5 mL 加入到 0.5 mL 0.4 mol/L 的 DPPH 甲醇溶液中, 混匀后静置 30 min, 在 517 nm 处测定吸光度, 然后计算其对 DPPH· 的半数清除率(IC_{50})。 IC_{50} 指自由基清除率为 50% 时样品的浓度。以提取液浓度为自变量, 清除率为因变量进行曲线拟合, 根据拟合方程计算 IC_{50} ^[24]。 IC_{50} 值越小, 表明其抗氧化能力越强, 清除自由基的能力越强。

参照郭小补等^[25]的方法分别采用 Fenton 反应试剂盒和黄嘌呤氧化酶反应试剂盒测定不同浓度泡腾溶液清除羟自由基和超氧阴离子自由基活力。

清除羟自由基($\cdot\text{OH}$)活力(U/g)=(对照管 D- 测定管 D)/(标准管 D- 空白管 D)×标准管浓度×[1 mL/取样量(mL)]×样品稀释倍数。

清除超氧阴离子自由基($\text{O}_2^- \cdot$)活力(U/g)=(对照管 D- 测定管 D)/(标准管 D- 空白管 D)×标准管浓度×1 000 mL×样品稀释倍数。

1.4 数据统计分析

所有步骤均重复 3 次以上, 数据处理采用 SPSS 13.0 和 origin 8.6 软件包建立数据库, 进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 桑叶提取物的制备

添加不同质量浓度麦芽糊精在不同干燥时间条件下桑叶提取物的含水量如图 1 所示。

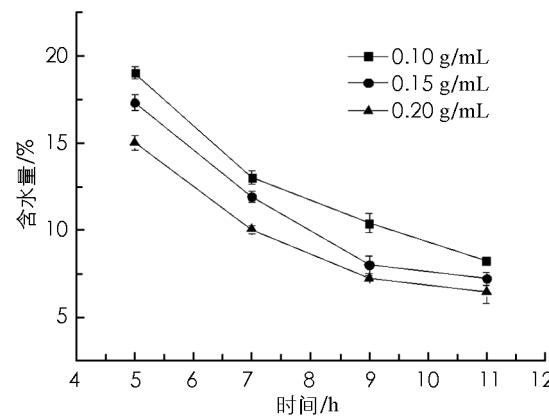


图 1 不同麦芽糊精质量浓度及不同干燥时间条件下桑叶提取物的含水量

由图1可知,干燥时间小于7 h时,不同麦芽糊精质量浓度的桑叶提取物的含水量下降幅度较大;随着干燥时间延长(7~9 h),桑叶提取物含水量缓慢下降;干燥至9~11 h时,桑叶提取物含水量趋于平稳。考虑实际生产情况,冷冻干燥时间越长,能耗越大,故选取9 h为最佳干燥时间。9 h时,麦芽糊精质量浓度为0.15 g/mL和0.20 g/mL的两组提取物含水量差别不大,且麦芽糊精质量浓度过高易使粉末质量下降,故选择最适麦芽糊精质量浓度为0.15 g/mL。得到的桑叶提取物经真空冷冻干燥后不会发生收缩现象,呈疏松多孔海绵状,研磨得到的粉末可直接用于压片^[26]。

2.2 泡腾片配方研究

桑叶提取物粉末、酸和碱的用量正交试验结果见表3。

表3 $L_9(3^4)$ 正交试验结果

试验号	因 素			总得分
	A	B	C	
1	1	1	1	7
2	1	2	2	11
3	1	3	3	7
4	2	1	2	14
5	2	2	3	16
6	2	3	1	15
7	3	1	3	10
8	3	2	1	18
9	3	3	2	9
K_1	25	31	40	
K_2	45	45	34	
K_3	37	33	35	
R	20	14	6	

由表3看出,各因素对泡腾片感官指标的影响由大到小大小顺序为A>B>C,最优组合为 $A_2B_2C_1$ 。因C因素中综合平均值最大为 C_1 ,但 C_2 和 C_3 之间差异很小,考虑碳酸氢钠用量太大会使溶液有碱的苦味,故选取 C_2 作为C因素的最优水平。因此,确定最佳方案为 $A_2B_2C_2$,即桑粉用量为5%,柠檬酸12%,碳酸氢钠8%。

经湿法制粒所得泡腾片外观完整光洁,呈均匀浅绿色;平均硬度达105 N;平均片质量为4.85 g,无超出质量差异限度的药片;崩解时限为4.5 min,符合药典规定。

2.3 泡腾片体外抗氧化活性

由图2可以看出,桑叶提取物泡腾片对羟自由基,DPPH自由基和超氧阴离子自由基都具有清除作用, IC_{50} 分别为49.78,77.12和94.98 mg/mL,且清除作用与浓度之间存在着较好的线性量效关系。桑叶提取物泡腾片对羟自由基的清除作用最强,对DPPH自由基的清除作用稍高于超氧阴离子自由基,这与之前的研究相一致^[27~28]。泡腾片溶液的抗氧化作用随着浓度的增加而增加,当浓度达到约75 mg/mL时,抗氧化作用趋于平稳。本研究中的桑叶提取物泡腾片的 IC_{50} 明显高于其他研究^[26,29]中桑叶提取物的 IC_{50} ,即抗氧化活性与桑叶提取物相比较低,这可能是由于提取物中添加了麦芽糊精并且泡腾片制备时添加的填充物含量较高,而桑叶提取物的加入量仅为5%所致。

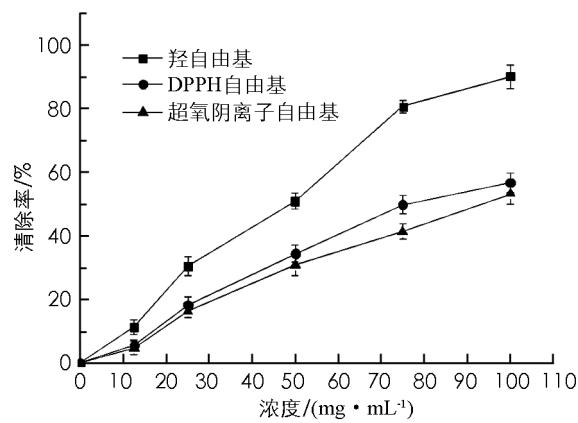


图2 桑叶提取物泡腾片体外抗氧化活性

3 结 论

本实验通过酸化60%乙醇溶液超声波萃取方法提取桑叶生物活性物质,添加0.15 g/mL麦芽糊精真

空冷冻干燥9 h后体积几乎不变,呈疏松多孔海绵状,易于粉碎,制成的片剂易溶于水,较好地保护了桑叶的功能性成分。以桑叶提取物冻干粉为活性物质,柠檬酸和碳酸氢钠为崩解剂,复配葡萄糖、蔗糖、柠檬酸和甘露醇,经湿法制粒压片生产出的泡腾片质量稳定,口感较好,感官、片质量差异、崩解时限各项指标均符合药典规定。制得的桑叶提取物泡腾片对羟自由基,DPPH自由基和超氧阴离子自由基都具有一定的清除作用。

参考文献:

- [1] HE Jun, FENG Ying, OUYANG Hui-zi, et al. A Sensitive LC-MS/MS Method for Simultaneous Determination of six Flavonoids in Rat Plasma: Application to a Pharmacokinetic Study of Total Flavonoids from Mulberry Leaves [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2013, 84: 189—195.
- [2] KOTARO H C K, MASATOSHI W N N. Differential Effects of Sugar-Mimic Alkaloids in Mulberry Latex on Sugar Metabolism and Disaccharidases of Eri and Domesticated Silkworms: Enzymatic Adaptation of Bombyx Mori to Mulberry Defense [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2007, 37(12): 1348—1358.
- [3] YING Zhi, HAN Xiao-xiang, LI Jian-rong. Ultrasound-Assisted Extraction of Polysaccharides from Mulberry Leaves [J]. Food Chemistry, 2011, 127(3): 1273—1279.
- [4] MASOOD S B, AKMAL N, SULTAN M T, et al. *Morus alba* L. Nature's Functional Tonic [J]. Trends in food science and technology, 2008, 19 (10): 505—512.
- [5] 李蔓荻,靳婷.食物是最好的药——细说国家卫生部推荐的87种药食两用食物 [M].北京:金城出版社,2010: 101.
- [6] JACOB S, SHIRWAIKAR A, NAIR A. Preparation and Evaluation of Fast-Disintegrating Effervescent Tablets of Glibenclamide [J]. Drug Development and Industrial Pharmacy, 2009, 35(3): 321—328.
- [7] BEMAL J, MENDIOLA J A, IBÁÑEZ E, et al. Advanced Analysis of Nutraceuticals [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2011, 55(4): 758—774.
- [8] POTHINUCH P, TONGCHITPAKDEE S. Melatonin Contents in Mulberry (*Morus* spp.) Leaves: Effects of Sample Preparation, Cultivar, Leaf Age and Tea Processing [J]. Food Chemistry, 2011, 128(2): 415—419.
- [9] 张颖.桑叶绿茶复合饮料的研制 [J].食品工业,2013,34(1): 43—45.
- [10] SRIVASTAVA S, KAPOOR R, THATHOLA A, et al. Mulberry (*Morus alba*) Leaves as Human Food: A New Dimension of Sericulture [J]. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 2003, 54(6): 411—416.
- [11] 刘树兴,罗霄山.桑叶饮料的研制 [J].食品科学,2011(Z1): 113—115.
- [12] 刘杰,潘见,张文成,等.富含黄酮和生物碱的桑叶提取物的提取工艺研究 [J].食品科学,2009,30(12): 52—56.
- [13] 徐良增,许时婴,杨瑞金.浅述麦芽糊精 [J].食品科学,2001,22(5): 87—90.
- [14] 王淑华,林永强.泡腾片的常用辅料及制备方法 [J].食品与药品,2006,8(3): 70—72.
- [15] LIU Yan-mei, LIU Yun, CHUAN Lu, et al. Relative Bioavailability of Generic and Branded Acetylcysteine Effervescent Tablets: A Single-Dose, Open-Label, Randomized-Sequence, Two-Period Crossover Study in Fasting Healthy Chinese Male Volunteers [J]. Clinical Therapeutics, 2010, 32(12): 2097.
- [16] GADIOLI I L, PINELI L L O, RODRIGUES J S Q, et al. Evaluation of Packing Attributes of Orange Juice on Consumers' Intention to Purchase by Conjoint Analysis and Consumer Attitudes Expectation [J]. Journal of Sensory Studies, 2013, 28(1): 57—65.
- [17] MUIR D D. Sensory Analysis for Food and Beverage Quality Control-A Practical Guide [J]. International Journal of Dairy Technology, 2011, 64(3): 458
- [18] 杨伟丽,唐颖,龚雨顺.乌龙茶品种风味与工艺技术及其化学因子的关系 [J].食品科学,2004,25(4): 65—68.
- [19] 宫江宁,吴金鸿,王正武,等.紫苏提取物泡腾片的研制 [J].食品科学,2013,34(6): 280—284.
- [20] 中华人民共和国国家药典委员会.中国药典:二部 [M].北京:化学工业出版社,2005:附录IA.
- [21] 李家华,赵明,胡艳萍,等.普洱茶发酵过程中黄酮醇物质含量变化的研究 [J].西南大学学报:自然科学版,2012,34(2): 51—65.
- [22] 陈志伟,陈坤,胡银川,等.响应面法对苦丁茶总黄酮提取工艺的优化 [J].西南大学学报:自然科学版,2012,34(5): 119—125.
- [23] CHANG L W, JUANG L J, WANG B S, et al. Antioxidant and Antityrosinase Activity of Mulberry (*Morus alba* L.) Twigs and Root Bark Original Research Article [J]. Food and Chemical Toxicology, 2011, 49(4): 785—790.

- [24] 吕禹泽, 宋 钰, 吴国宏, 等. 葡萄多酚的抗氧化活性 [J]. 食品科学, 2006, 27(12): 213—216.
- [25] 郭小补, 廖森泰, 刘吉平, 等. 不同桑品种的桑叶总黄酮含量与体外抗氧化活性的相关性 [J]. 蚕业科学, 2008, 34(3): 381—386.
- [26] WANYO P, SIRIAMOMPUN S, MEESO N. Improvement of Quality and Antioxidant Properties of Dried Mulberry Leaves with Combined Far-Infrared Radiation and Air Convection in Thai Tea Process [J]. Food and bioproducts processing, 2011, 89(1): 22—30.
- [27] 王洪侠. 桑不同提取物体外抗氧化活性的比较研究 [J]. 赤峰学院学报: 自然科学版, 2008, 24(1): 104—107.
- [28] ARABSHAHI-DELOUEE S, UROOJ A. Antioxidant Properties of Various Solvent Extracts of Mulberry (*Morus indica* L.) leaves [J]. Food Chemistry, 2007, 102(4): 1233—1240.
- [29] 潘剑用, 汪志平, 党江波, 等. 夏桑叶的体外抗氧化活性及其主要功能成分研究 [J]. 核农学报, 2011, 25(4): 754—759.

On Preparation of Original Mulberry Essence Effervescent Tablets

LI Guan-nan¹, XIA Xue-juan², ZHAO Huan-huan¹,
WU Xue-ying², YANG Rui-lian², HENG Zhi-jie¹,
YANG Cheng-fei¹, ZHU Yong¹

1. College of Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. College of Food Science Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: To study the preparation technology and antioxidant activity in vitro of mulberry leaves extract effervescent tablets, research methods of extract and vacuum freeze-drying mulberry leaves bioactive substances have been explored according to the sensory evaluation and tabletting effect by means of choosing the appropriate effervescent tablets formulation. ultrasonic-assisted ethanol has been used to extract the functional components of mulberry leaves. The 180 μm sieve freeze-drying mulberry power has been obtained by adding 0.15 g/mL maltodextrin. The tablets could be prepared very well by the wet granulation process and the optimal formula is determined as follows: 5% of mulberry leaves extract, 12% of citric acid, 7.5% of sodium bicarbonate, 7% of mannitol, 30% of glucose, 38.5% of sugar. The IC_{50} values of $\cdot\text{OH}$, DPPH \cdot and $\text{O}_2 - \cdot$ of mulberry leaves extract effervescent tablets are 49.78, 77.12 and 94.98 mg/mL respectively.

Key words: mulberry leaves; effervescent tablets; drying; formulation; preparation technology; antioxidant activity

责任编辑 周仁惠

