

一种植物提取方法

技术领域

本发明属于植物提取技术领域，具体涉及一种植物提取方法。

背景技术

天然植物提取物是指以植物为原料，按照提取的最终产品用途，经过物理化学提取分离，定向获取或浓集植物中某一种或多种有效成分而不改变其有效结构所得到的产物。植物提取物中含有丰富而复杂的有机成分，其中多数有机成分具有抗菌、抑菌、抗氧化、调节机体免疫功能等生物活性。由于植物提取物具有绿色、健康、安全、高效、无残留等优势，其在世界各地被大范围应用于医药、保健品、化妆品、食品添加剂、农药、饲料、日用品等领域。我国是桑蚕产业的发源地，桑科植物因具有较高的营养价值和药用价值，自古以来就被认作是药食两用的珍贵材料，在历代中医药典籍中均有记载，如早在《本草纲目》中便有“桑叶汁煎代茗，能止消渴”，“炙熟煎饮，代茶止渴”的记载。现代科学也证实了桑科植物的营养成分、药理活性成分以及作用机理，研究表明桑科植物中的化学成分主要包括黄酮类化合物、多糖类化合物、生物碱和氨基酸，此外还有一些挥发油、鞣质、琥珀酸、腺嘌呤、维生素等，具有抗真菌、消炎、降血糖、抗氧化等作用。

植物提取方法可分为经典提取方法和现代提取方法，经典提取方法不需要特殊仪器，简单易操作，提取成本较低，主要包括溶剂提取法，水蒸气蒸馏法等，现代提取方法是以现代先进的仪器为基础或新发展起来的提取方法，主要包括超声波提取法、微波提取法、酶提取法、固相萃取法等。植物提取物成分可分为亲脂性和亲水性，针对不同植物提取物可选择不同的溶剂和/或提取方法获得，例如，对于亲脂性植物成分，可用有机溶剂进行渗漉、冷浸、超声、微波、回流提取等，对于水溶性成分，常用的一种提取方法是水提醇沉法，该方法对中药提取物的精制除杂、提高有效成分含量、减少服用量、方便生产成型等具有重要意义。具体步骤包括例如水提、浓缩、醇沉、干燥等步骤，其中，醇沉是指在粗提液中加入乙醇到适当浓度使难溶于乙醇的杂质沉淀析出，然后通过固液分离达到精制目的。例如常星洁等按照水煎煮-浓缩-乙醇沉淀-回收乙醇的步骤提取连翘有效成分（常星洁，丁倩.连翘水提醇沉工艺链中连翘酯苷A和连翘苷及抑菌活性的变化[J].中医药导报,2018,24(9): 39-41.）；沈爱英等采用水提和乙醇醇析方法得到桑叶多糖（沈爱英，朱子玉，张文良.桑叶水溶性多糖提取工艺的研究[J].蚕业科学,2004,30(3):277-279.）。为了进一步浓缩富集有效成分，在醇沉处理后还可

进行树脂分离、膜分离、超滤、透析等，以达到纯化目的。

消费者对植物提取物产品日益增长的需求促使植物提取工艺有了较大的发展，产品品质也有所提高，但与发达国家相比，我国的植物提取物还存在一些突出问题，其中，重金属、农药残留等产品安全问题引起了广泛的关注。研究发现一些植物对环境中的重金属（如铜、铅、镉、锌等）具有富集作用，例如张兴等研究显示在重金属含量为铜Cu(593.56 mg/kg)、铅Pb(825.41 mg/kg)、镉Cd(8.11 mg/kg)、锌Zn(705.41 mg/kg)的土壤上种植桑树，测得其根中重金属含量高达：Cu 33.13 mg/kg，Pb 33.13 mg/kg，Cd 4.53 mg/kg，Zn 317.72 mg/kg，叶中重金属含量高达：Cu 13.18 mg/kg，Pb 10.32mg/kg，Cd 1.90 mg/kg，Zn 186.53 mg/kg，远远超过了相关规定（根据《药用植物及制剂进出口绿色行业标准》规定，植物原料、饮片、提取物及制剂中重金属总量 $\leq$ 20.0 mg/kg，铅Pb $\leq$ 5 mg/kg，镉Cd $\leq$ 0.3 mg/kg，汞Hg $\leq$ 0.2mg/kg，铜Cu $\leq$ 20.0 mg/kg，砷As $\leq$ 2.0 mg/kg）。如何最大程度降低重金属等有害物质的残留是植物提取方法研究中需要考虑的重要方面。

发明内容

在一般研究和工业生产过程中，水溶性植物提取物一般通过水提醇沉法得到，在考虑提高特定成分含量的时候会在醇沉处理之后进行树脂分离、膜分离、超滤、透析等进一步富集纯化。但是对于植物提取物，尤其是像桑科植物这样容易富集环境中的重金属的植物而言，采用这种提取方法获得提取物并不足以除去其中的重金属残留。本发明人通过反复研究发现，在植物提取过程中，对粗提液依次进行树脂分离、浓缩和醇沉处理不仅能够提高有效成分分离效率，而且能够显著降低植物提取物中的重金属残留。基于该发现，本发明人提供一种新的植物提取方法，该方法能够有效降低植物提取物中的重金属含量，同时大大减少提取过程中的乙醇用量，从而在提高产品品质的同时降低生产成本，并在一定程度上提高工业生产效率和安全性。

鉴于此，第一方面，本发明提供了一种植物提取方法，其特征在于，包括以下步骤：

步骤1)：制备植物粗提液；

步骤2)：所述粗提液经阳离子树脂分离，收集洗脱液，任选地，所述洗脱液经阴离子树脂分离，收集流出液；

步骤3)：对步骤2)得到的收集液进行浓缩处理；

步骤4)：对步骤3)得到的浓缩液进行醇沉处理；

任选的步骤5) 浓缩干燥处理。

1) 制备植物粗提液

在本发明中, 所述植物优选桑科 (Moraceae)、百合科 (Liliaceae)、桔梗科 (Campanulaceae)、鸭跖草科 (Commelinaceae) 植物, 进一步优选桑属 (*Morus*)、风信子属 (*Hyacinthus*)、沙参属 (*Adenophora*)、鸭跖草属 (*Commelina*) 植物, 更优选地, 所述植物为鲁桑 (*Morus multicaulis* Perrott.)、白桑 (*Morus alba* L.)、广东桑 (*Morus atropurpurea* Roxb.)、瑞穗桑 (*Morus mizuho* Hotta)、长穗桑 (*Morus wittiorum* Hand Mazz.)、长果桑 (*Morus laevigata* Wall.)、黑桑 (*Morus nigra* Linn.)、华桑 (*Morus cathayana* Hemsl.)、细齿桑 (*Morus serrata* Roxb.)、蒙桑 (*Morus mongolica* Schneid.)、山桑 (*Morus bombycis* Koidz.)、川桑 (*Morus notabilis* Schneid.)、唐鬼桑 (*Morus nigrifomis* Koidz.)、滇桑 (*Morus yunnanensis* Koidz.)、鸡桑 (*Morus australis* Poir.)、鬼桑 (*Morus mongolica* (Bur.) Schneid. var. *diabolica* Koidz.)、大叶桑、垂枝桑 (*Morus alba* Var. *Pendula* Dippel)、白脉桑及用以上桑种育成的桑树品种、以上桑种的种内或种间选育的杂交桑, 以及风信子 (*Hyacinthus orientalis*)、沙参 (*Adenophora triphylla* var. *japonica*)、鸭跖草 (*Commelina communis*) 中的任意一种或多种的组合; 优选地, 所述植物选自广东桑、鲁桑、白桑、细齿桑、山桑或杂交桑, 所述杂交桑优选为粤桑11号、桂桑优62号或桑特优2号。可以使用所述植物的叶、根、枝、皮、芽、茎、果实等各部位。

可采用醇水、水、碱性水溶液或者酸性水溶液等溶剂对所述植物进行粗提, 优选地, 粗提所采用的溶剂为水。

提取时, 优选将植物粉碎后加入水中进行热提取, 提取时间优选为每次0.5-3h, 提取次数1-3次。

在一种优选的实施方式中, 可以将粉碎后的植物加入提取罐中进行提取。

提取时溶剂的加入量越多植物的提取率越高, 但溶剂加入量过多会对增加后续分离纯化的难度, 优选溶剂的加入量为植物原材料投料重量的3-20倍, 更优选为4-15倍, 可以最大程度获得植物提取物, 又不过多增加溶液体积而增加后续处理的难度。

可以使用煎煮法、超声提取法或回流提取法进行提取, 优选使用煎煮法或回流提取法进行提取; 更优选使用工业设备更成熟的煎煮法进行提取。

任选地, 可以重复提取, 合并提取液。

优选地, 过滤提取液除去不溶物, 得到植物粗提液。

2) 经阳离子树脂和任选的阴离子树脂分离

本发明使用离子交换树脂对植物粗提液中的组分进行分离。

步骤2) 中, 将植物粗提液上样至阳离子树脂, 经阳离子树脂分离。优选地, 在阳离子树脂装柱后, 按照酸性溶液洗、碱性溶液洗、酸性溶液洗的

顺序进行活化。通过树脂活化方法还可实现树脂环境pH值的调节,进而优化阳离子树脂的吸附选择性,提高分离效果。

优选地,碱性溶液洗至洗出液pH为8.0-9.5,优选为8.5-9.5;

优选地,所述碱性溶液选自氨水溶液、氢氧化钠溶液、氢氧化钾溶液或碳酸钠溶液,优选为氨水溶液、氢氧化钠溶液;优选地,所述碱性溶液的浓度为0.5-4mol/L,优选为1-2 mol/L。

优选地,酸性溶液洗至洗出液pH为3.0-7.0,优选为4.5-6.5。

优选地,所述酸性溶液选自盐酸溶液、磷酸溶液、磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液,更优选为磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液。优选地,所述酸性溶液的浓度为0.5-4mol/L,优选为1-2 mol/L。

使用磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液作为酸性溶液时,所述磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液的pH值优选为4.0-6.5,更优选为4.5-5.0。

任选地,所述阳离子树脂经最后一次酸性溶液洗后还可以使用3-5倍柱体积的去离子水冲洗。

优选地,所述阳离子树脂选自强酸性阳离子交换树脂、弱酸性阳离子交换树脂和强碱性季铵型阳离子树脂中的一种或多种的组合。

优选地,所述阳离子树脂选自732型强酸性苯乙烯系阳离子交换树脂、734型强酸性苯乙烯系阳离子交换树脂、002SC型强酸性苯乙烯系阳离子交换树脂、D001型大孔强酸性苯乙烯系阳离子交换树脂、D113型大孔弱酸性苯乙烯系阳离子交换树脂和D254型大孔强碱性季铵型阳离子交换树脂中的一种或多种的组合;

优选地,所述阳离子树脂为732型强酸性苯乙烯系阳离子交换树脂、734型强酸性苯乙烯系阳离子交换树脂和D001型大孔强酸性苯乙烯系阳离子交换树脂。

研究发现,不受任何理论的束缚,阳离子交换树脂的上样过程对植物组分的吸附和分离效果有明显影响,特别是上样溶液的浓度以及树脂的用量。

优选地,所述阳离子树脂的用量与植物原材料投料重量比为1:1-30,优选为1:1-25,更优选为1:2-20。

上样植物粗提液至阳离子树脂后,用洗脱剂对上样后的阳离子树脂进行洗脱,优选地,所述洗脱剂为含有阳离子的盐溶液或碱性溶液,优选氯化钠、氯化铵、硫酸铵、硝酸铵、氨水、氯化钾和氢氧化钠中的一种或多种。

优选地,所述洗脱剂中阳离子的浓度为0.04-5mol/L,优选为0.2-3mol/L,更优选为0.5-2.5mol/L。

优选地,洗脱剂流速为1-15BV/h,优选为5-10 BV/h。

优选地,阳离子树脂分离所用的洗脱剂重量为植物原材料投料重量

0.1-30倍，优选地，为植物原材料投料重量0.5-10倍量的洗脱剂进行洗脱。

当洗脱液流出阳离子树脂时开始收集。可根据阳离子树脂流出液的pH来确定收集起始点，例如，选用氨水等碱性溶液进行洗脱时，当阳离子树脂流出液的pH>7时开始收集；也可根据待分离组分的性质确定收集起始点，例如，可以利用显色或沉淀反应确定流出液的收集起点；还可以使用高效液相等检测方法确定收集起始点。优选地，当收集液的体积达到植物原材料投料重量的0.1-10倍时，停止收集，更优选地，当收集液体积达到植物原材料投料重量的0.2-5倍时，停止收集。

在进行阳离子树脂分离时可以采用固定床离子交换工艺，也可以采用连续离子交换工艺。优选选用自动化程度更高的连续离子交换工艺。

为了提高阳离子树脂的分离效果，还可以使用阳离子树脂多次分离，例如分离2-5次。

任选地，收集的洗脱液经阴离子树脂分离。经所述阴离子树脂分离时，在阴离子树脂装柱后，按照碱性溶液洗、酸性溶液洗、碱性溶液洗的顺序进行活化；

优选地，酸性溶液洗至洗出液pH为3.0-7.0，优选为4.5-6.5；

优选地，所述酸性溶液选自自盐酸溶液、磷酸溶液、磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液，更优选为磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液；优选地，所述酸性溶液的浓度为0.5-4mol/L，优选为1-2 mol/L。使用磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液作为酸性溶液时，所述磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液的pH值优选为4.0-6.5，更优选为4.5-5.0。

优选地，碱性溶液洗至洗出液pH为8.0-9.5，优选为8.5-9.5；

优选地，所述碱性溶液选自氨水溶液、氢氧化钠溶液、氢氧化钾溶液或碳酸钠溶液，优选为氢氧化钠溶液；优选地，所述氢氧化钠溶液的浓度为0.5-4mol/L，优选为1-2 mol/L。

优选地，所述阴离子树脂为选自强碱性阴离子交换树脂、弱碱性阴离子交换树脂或弱酸性阴离子交换树脂中的一种或多种组合。

优选地，所述阴离子树脂选自717型强碱性苯乙烯系阴离子交换树脂、711型强碱性苯乙烯系阴离子交换树脂、D201型大孔强碱性苯乙烯系阴离子交换树脂、D218型大孔强碱性丙烯酸系阴离子交换树脂、D301-G型大孔弱酸性苯乙烯系阴离子交换树脂和D301型大孔弱碱性苯乙烯系阴离子交换树脂中的一种或多种的组合。

优选地，所述阴离子树脂为717型强碱性苯乙烯系阴离子交换树脂，D201型大孔强碱性苯乙烯系阴离子交换树脂和D218型大孔强碱性丙烯酸系阴离子交换树脂。

优选地，所述阴离子树脂的用量与植物原材料投料重量比为1:1-80，优选为1:1-64，更优选为1:1-32。

当液体流出阴离子树脂时开始收集。优选地，当收集液的体积达到植物原材料投料重量的0.05-10倍时，停止收集，更优选地，当收集液体积达到植物原材料投料重量的0.1-5倍时，停止收集。

任选地，为了提高阴离子树脂的分离效果，还可以使用阴离子树脂多次分离，例如分离2-4次。

优选地，所述提取方法还包括：在步骤2)所述分离前，将所述植物粗提液进行浓缩处理的步骤；

浓缩粗提液的方法包括热浓缩、纳滤膜、反离子渗透膜浓缩及其组合。

优选使用热浓缩、反离子渗透膜或其组合进行浓缩，以提高植物粗提液的浓度。

优选地，使用反离子渗透膜和纳滤膜进行浓缩时，为了提高浓缩效率，在进行反离子渗透膜和纳滤膜浓缩前可先进行离心、超滤膜过滤或者微滤膜过滤除杂。

优选地，将植物粗提液浓缩至溶液中固形物的质量浓度为1-15%，优选为2-10%。所述固形物是指溶液中水分去除后留存的固体物质。

任选地，在步骤2)的树脂分离处理前还可以对经浓缩处理的粗提液进行醇沉处理。在醇沉处理时，向粗提液加入乙醇，搅拌混匀，停止搅拌静置一定时间，使其中的不溶物沉淀。优选地，向植物粗提液中加入0.2-20倍体积的乙醇，优选加入0.4-10倍体积的乙醇。更优选地，使用醇沉罐进行醇沉处理。优选地，醇沉处理中的搅拌速度为10-600rpm，优选为40-500rpm，更优选为80-400rpm。

3) 对步骤2)得到的收集液进行浓缩处理

步骤3)的浓缩处理方法包括热浓缩、纳滤膜、反离子渗透膜浓缩及其组合。优选地，在进行反离子渗透膜和纳滤膜浓缩前先进行离心、超滤膜过滤或者微滤膜过滤除杂。

优选地，步骤3)得到的浓缩液体比重为1.0-1.3。该比重是指同体积条件下，所述浓缩液体与水的质量比。

4) 醇沉处理

步骤4)的醇沉处理中，使用乙醇对步骤3)的浓缩液进行处理，具体而言，向步骤3)的浓缩液中加入乙醇，搅拌混匀，停止搅拌静置一定时间，使其中的不溶物沉淀。

优选地，在步骤4)中，醇沉处理所用的乙醇与植物原材料投料重量比为1:4-600，优选为1:20-300。

醇沉处理优选在醇沉罐内进行。

优选地，步骤4)醇沉处理中，搅拌速度为10-600rpm，优选为40-500rpm，更优选为80-400rpm。

5) 浓缩干燥处理

任选地，所述提取方法还包括：步骤5)浓缩干燥处理。

将醇沉溶液过滤除去不溶物，减压浓缩得到植物提取物浸膏或干燥得到干燥物。

第二方面，本发明提供一种根据上述提取方法得到的植物提取物。

优选地，根据本发明上述提取方法得到的植物提取物中包含重量含量为3%以上的生物碱（优选包含重量含量为3-99%的生物碱，更优选包含重量含量为15-99%的生物碱，进一步优选地，包含重量含量为45-99%的生物碱，例如35-70%，或者60-75%），和/或包含重量含量不高于70%的多糖（优选包含重量含量为0.2-50%的多糖，更优选包含0.2-35%的多糖），和/或包含重量含量不高于10%的黄酮（优选包含重量含量为0.05-5%的黄酮，更优选包含0.05-2%的黄酮），和/或包含重量含量不高于50%的氨基酸（优选包含重量含量为0-40%的氨基酸，更优选包含0-25%的氨基酸），和其它组分（重量含量优选为0-25%，更优选为0-20%）。各组分含量之和为100%，其中，各组分是指包括生物碱、多糖、黄酮和氨基酸在内的所述植物提取物中的全部组分，即所述植物提取物中，除了生物碱、多糖、黄酮和氨基酸，还含有其它组分。

优选地，本发明上述提取方法得到的植物提取物中包括以下重量比的各组分：

生物碱	3-99%；
多糖	0.2-70%；
黄酮	0-10%；
氨基酸	0-50%；
其它组分	0-25%。

优选地，本发明上述提取方法得到所述植物提取物包括以下重量比的各组分：

生物碱	5-99%；
多糖	0.2-50%；
黄酮	0.05-5%；
氨基酸	0-40%，
其它组分	0-20%。

进一步优选地，本发明上述提取方法得到所述植物提取物包括以下重量比的各组分：

生物碱	30-99%;
多糖	0.2-35%;
黄酮	0.05-2%;
氨基酸	0-25%,
其它组分	0-20%。

优选地，所述生物碱中包含重量含量为30-99%的1-脱氧野尻霉素(1-DNJ)，优选为50-95%，更优选为55-90%，更优选为60-90%；

第三方面，本发明提供一种药物组合物，其包含上述植物提取物以及任选存在的药学上可接受的辅料。

所述辅料为符合用药途径或给药方式的对人体无毒害作用的非活性成分。

所述辅料可以是固体或液体辅料。固体辅料，例如，包括乳酸钠、泊洛沙姆、十二烷基硫酸钠、羧甲基纤维素钠、明胶、黄原胶、聚维酮、淀粉、硬脂酸镁、羧甲基淀粉钠和滑石粉；液体辅料，例如，包括水、乙醇、糖浆和甘油。

优选地，所述药物组合物的剂型包括口服给药制剂；

优选地，所述药物组合物的剂型包括：片剂、胶囊剂、口服溶液剂、口服乳剂、丸剂和颗粒剂；

根据病人的年龄、体重、健康状况、饮食、给药途径、联合用药、治疗时间等，具体的用药剂量可能会存在个体差异。

第四方面，本发明提供了一种上述植物提取物或上述药物组合物在制备降糖药物中的用途。

另一方面，本发明提供了一种上述植物提取物或上述药物组合物在制备治疗糖耐量异常的药物中的用途。

又一方面，本发明提供了一种上述植物提取物或上述药物组合物在制备预防和/或治疗血糖异常相关疾病的药物中的应用，所述疾病包括但不限于，糖尿病、糖尿病肾病、糖尿病足、糖尿病眼部并发症、高血糖症、高尿酸症、高血脂症、肠道菌群失调，以及诸如脑梗塞、脑出血、冠心病、高血压之类的心脑血管疾病。

本发明还提供了一种上述植物提取物或上述药物组合物在制备降脂药物中的应用。

本发明还提供了一种上述植物提取物或上述药物组合物在制备调节肠道菌群的药物中的应用。

再一方面，本发明提供了一种食品、保健品或饮品，其特征在于，所述食品、保健品或饮品包含上述植物提取物以及任选存在的食品、保健品或饮

品上可接受的辅料。

本发明还提供了上述植物提取物在制备食品、保健品或饮品中的用途。优选地，所述食品、保健品或饮品为具有降糖功效的功能食品、保健品或饮品。

本发明所述植物原材料是指用于提取的植物原料，包括但不限于新鲜的或经加工处理的植物或植物部位。

本发明对植物粗提液依次进行树脂分离、浓缩以及醇沉的处理步骤，与常规的提取方法相比，具有以下有益效果：

1、重金属含量水平显著降低；

2、常规水提醇沉法所用的乙醇是植物原材料投料重量的1/4-5倍，而本发明的提取方法所用的乙醇量可低至植物原材料投料重量的1/600，大大减少了乙醇用量，在一定程度上降低生产成本，便于工业化生产，提高生产过程的安全性。

附图说明

图1 是实施例1、2、3、5和6所获得的植物提取物的大鼠蔗糖耐量试验。

具体实施方式

下面通过附图和实施例对本发明进一步详细说明。通过这些示例性说明，本发明的特点和优点将变得更为清楚明确。

在这里专用的词“示例性”意为“用作例子、实施例或说明性”。这里作为“示例性”所说明的任何实施例不必解释为优于或好于其它实施例。

此外，下面所描述的本发明不同实施方式中涉及的技术特征只要彼此之间未构成冲突就可以相互结合。

本发明所涉及的检测方法包括：

1、生物碱含量测定：

取提取物适量，加水超声使其溶解制得供试品溶液；另精密称取1-脱氧野尻霉素对照品适量，加水溶解配制对照品溶液。分别精密量取对照品溶液和供试品溶液适量，加入碳酸氢钠溶液，摇匀，再加9-氯甲酸苄甲酯（FMOC-Cl）丙酮溶液，30℃加热30min，加入乙酸终止反应，摇匀，滤过，精密吸取续滤液注入液相色谱仪，根据峰面积按外标法计算供试品中1-脱氧野尻霉素和总生物碱的含量（以1-脱氧野尻霉素计，计算相对保留时间在0.4-1.7范围内的色谱峰）（参考文献：夏学军，汪仁芸，刘玉玲. 柱前衍生化RP-HPLC法测定桑枝总生物碱的含量[J]. 中国新药杂志，2008，17(23):2044-2047.）。

2、氨基酸含量测定：

取提取物适量，加水超声使其溶解制得供试品溶液；另精密称取混合氨基酸对照品适量，加水溶解配制对照品溶液。其余操作同生物碱含量测定。

3、多糖含量测定：

精密称取提取物适量，加水超声提取，于4000rpm条件下离心10min，取上清液为供试品溶液。精密量取上述供试品溶液2ml，置具塞试管中，加入0.1%蒽酮硫酸试剂6ml，沸水浴中加热15min，冰水浴中放置15min后，以相应试剂为空白，立即于625nm测定吸光度值，根据葡萄糖线性回归方程计算供试品中以葡萄糖计多糖浓度，根据下式计算含量：含量=C*D*f/W，式中：W为样品质量，C为以葡萄糖计多糖浓度，f为换算因子（3.38），D为稀释因子（参考文献：张作法，金洁，时连根.桑枝多糖的含量测定方法，中国中药杂志[J].2018,33（4）：462-464）。

4、黄酮含量测定：

称取芦丁对照品适量，加60%乙醇溶解，得芦丁对照品贮备液，分别精密量取0.5、1.0、3.0、5.0、7.0ml至25ml量瓶中，分别加入5%亚硝酸钠溶液，10%硝酸铝溶液，1N NaOH溶液10ml，然后加水稀释至刻度，摇匀，作为对照品溶液。以空白基准溶液为参比，在500nm处测定吸光度值，绘制线性回归方程。

精密称取提取物适量，加入60%乙醇溶液超声溶解，摇匀，4000rpm离心10min后，取上清液作为黄酮提取液。精密量取黄酮提取液2.0ml，分别加入5%亚硝酸钠溶液，10%硝酸铝溶液，1N NaOH溶液10ml，然后加水稀释至刻度，摇匀，放置15min，5000rpm离心5min后，取上清液测定；另精密量取黄酮提取液2.0ml，不显色，仅加水稀释至25ml作为空白基准溶液。500nm处测定各反应液吸光度值，根据线性回归方程计算黄酮浓度，再根据称样量及稀释倍数计算供试品中以芦丁计的黄酮含量。

5、重金属含量检测

采用中国药典2015版第四部通则0821中的第二法检测重金属总含量，具体方法如下：

（1）标准铅溶液的制备。称取硝酸铅0.1599g，置1000ml量瓶中，加硝酸5ml与水50ml溶解后，用水稀释至刻度，摇匀，作为贮备液。分别精密量取贮备液0.5、1、2、5、8ml，置5ml量瓶中，加水稀释至刻度，摇匀，即得5ppm、10 ppm、20 ppm、30ppm、40 ppm、50 ppm、80ppm标准铅溶液。

（2）样品测定。取样品2g，缓缓炽灼至完全炭化，放冷，加硫酸0.5-1ml，

使恰湿润，用低温加热至硫酸除尽后，加硝酸0.5ml，蒸干，至氧化氮蒸气除尽后，放冷，在500-600℃炽灼使完全灰化，放冷，加盐酸2ml，置水浴上蒸干后加水15ml，滴加氨试液至对酚酞指示液显微粉红色，再加醋酸盐缓冲液（pH3.5）2ml，微热溶解后，移置纳氏比色管中，加水稀释成25ml作为检测管；另取配制供试品溶液的试剂，置瓷皿中蒸干后，加醋酸盐缓冲液（pH3.5）2ml与水15ml，微热溶解后，移置纳氏比色管中，分别加入（1）中标准铅溶液一定量，再用水稀释成25ml，作为对照管；再在检测管和对照管中分别加硫代乙酰胺试液各2ml，摇匀，放置2分钟，同置白纸上，自上向下透视，与对照管的颜色进行比对确定样品中重金属含量。

也可采用中国药典2015版第四部通则0412中的电感耦合等离子体质谱法（ICP-MS法）检测重金属铅、镉、汞、砷含量。

将重金属含量检测结果与《药用植物及制剂进出口绿色行业标准》进行比较，该标准规定植物原料、饮片、提取物及制剂中重金属总量 ≤ 20.0 mg/kg，铅Pb ≤ 5 mg/kg，镉Cd ≤ 0.3 mg/kg，汞Hg ≤ 0.2 mg/kg，铜Cu ≤ 20.0 mg/kg，砷As ≤ 2.0 mg/kg。

本发明人对两种重金属检测方法进行了比较，结果显示两种方法的测定结果一致，以本发明的方法得到的植物提取物的重金属含量符合《药用植物及制剂进出口绿色行业标准》的规定。优选地，以本发明的方法得到的植物提取物的重金属含量不超过20ppm，更优选地，不超过10ppm，进一步优选地，不超过5ppm。

实施例1

取新鲜桑葚（白桑）100g，粉碎后，加300ml醇水，分2次加入，每次加热回流提取1h，合并提取液，过滤除去不溶物，得到粗提液。经测定，粗提液中重金属含量为5-10ppm，铅5.44 ppm，镉0.38 ppm，汞0.06 ppm，砷0.47 ppm。粗提液经热浓缩至固形物含量达到2%，保温25℃作为阳离子树脂柱的上样液。

使用732型强酸性苯乙烯系阳离子树脂5g装柱，使用2.5mol/L的盐酸溶液洗至洗出液pH为3.5；使用1.5 mol/L氢氧化钠溶液洗至洗出液pH为8.0；2.5mol/L的盐酸溶液洗至洗出液pH为3.5；再使用3倍柱体积的去离子水冲洗，完成活化。上样经浓缩处理的提取液，然后使用3L 0.1mol/L氨水洗脱，洗脱速度为10BV/h，检测阳离子柱流出液的pH>7时收集洗脱液，当收集液达到1L时，停止收集，将收集液直接过阴离子柱纯化。

使用D218型大孔强碱性丙烯酸系阴离子树脂1.25g装柱，使用1.5 mol/L氢氧化钠溶液洗至洗出液pH为9.0；使用1.5mol/L的盐酸溶液洗至洗出液pH为3.5；1.5 mol/L氢氧化钠溶液洗至洗出液pH为9.0；完成活化。将收集的阳

离子树脂洗脱液上样至阴离子树脂，收集流出液至流出液达到1L结束。

将经过阴离子柱分离后得到的收集液进行离心除杂然后经反离子渗透膜浓缩，浓缩后的液体比重为1.0，将其转移至醇沉罐内，搅拌浆100rpm下加入无水乙醇25g。乙醇加入完毕后停止搅拌，醇沉24h，取上清液，真空干燥，得提取物。

另外取新鲜桑枝、桑白皮、桑叶（白桑）进行提取，提取方法和参数与上述方法相同，其中，由桑枝、桑白皮、桑叶得到的粗提液的重金属含量均为5-10ppm，铅含量分别为5.51、5.87、6.12 ppm，镉含量分别为0.37、0.35、0.41ppm，汞含量分别为0.07、0.08、0.06ppm，砷含量分别为0.57、0.55、0.61ppm。

得到的桑葚、桑枝、桑白皮和桑叶提取物中的组分和重金属含量见表1。

表1 实施例1得到的植物提取物中的各组分含量和重金属含量

含量 \ 提取物	桑葚 提取物	桑枝 提取物	桑白皮 提取物	桑叶 提取物
生物碱%	45	48	45	30
多糖%	28	25	27	34
黄酮%	5	4	6	7
氨基酸%	20	17	18	30
生物碱中1-DNJ%	60	62	61	55
重金属总含量(ppm)	<5	<5	<5	<5
铅(ppm)	0.74	0.70	0.67	0.66
镉(ppm)	0.05	0.05	0.04	0.04
汞(ppm)	0.02	0.01	0.02	0.01
砷(ppm)	0.17	0.12	0.13	0.15

实施例2

取新鲜桑叶（广东桑）100g，粉碎后，加2000ml酸水，分2次加入，每次用煎煮法提取1h，合并提取液，过滤除去不溶物，得到粗提液。经测定，粗提液中重金属含量为10-20ppm，铅13.6 ppm，镉0.84 ppm，汞0.16 ppm，砷0.56 ppm。粗提液先离心除杂再进行反离子渗透膜过滤浓缩至固形物含量达到14.5%，将浓缩后的粗提液转移至醇沉罐内，搅拌浆300rpm下加入无水

乙醇80g（约100ml），乙醇加入完毕后停止搅拌，醇沉24h，取上清液作为阳离子树脂柱的上样液。

使用734型强酸性苯乙烯系阳离子树脂10g装柱，使用2mol/L的盐酸溶液洗至洗出液pH为4.5；使用1mol/L氢氧化钠溶液洗至洗出液pH为8.5；2mol/L的盐酸溶液洗至洗出液pH为4.5；再使用5倍柱体积的去离子水冲洗，完成活化。上样经浓缩醇沉处理的提取液，然后使用2L 0.5mol/L氨水洗脱，洗脱速度为8BV/h，检测阳离子柱流出液的pH>7时收集洗脱液，当收集液达到800ml时，停止收集，将收集液直接过阴离子柱纯化。

使用717型强碱性苯乙烯系阴离子树脂8g装柱，使用1.5 mol/L氢氧化钠溶液洗至洗出液pH为9.0；使用1.5mol/L的盐酸溶液洗至洗出液pH为3.5；1.5 mol/L氢氧化钠溶液洗至洗出液pH为9.0；完成活化。将收集的阳离子树脂洗脱液上样至阴离子树脂，收集流出液至流出液达到750ml结束。

将经过阴离子柱分离后得到的收集液进行热浓缩，浓缩后的液体比重为1.05，将其转移至醇沉罐内，搅拌桨200rpm下加入无水乙醇12.5g。乙醇加入完毕后停止搅拌，醇沉24h，取上清液，真空干燥，得提取物。

另外取新鲜桑枝和桑白皮（广东桑）进行提取，提取方法和参数与上述方法相同，其中，由桑枝、桑白皮得到的粗提液的重金属含量均为10-20ppm，铅含量分别为14.5、15.8ppm，镉含量分别为0.78、0.77ppm，汞含量分别为0.17、0.18ppm，砷含量分别为0.57、0.55ppm。

得到的桑枝、桑白皮和桑叶提取物中的组分和重金属含量见表2。

表2 实施例2得到的植物提取物中的各组分含量和重金属含量

含量 \ 提取物	桑枝 提取物	桑白皮 提取物	桑叶 提取物
生物碱%	80	75	60
多糖%	10	14	17
黄酮%	0.3	0.4	0.5
氨基酸%	5	6	18
生物碱中1-DNJ%	75	69	70
重金属总含量（ppm）	<5	<5	<5
铅（ppm）	0.65	0.73	1.13
镉（ppm）	0.03	0.02	0.08
汞（ppm）	0.01	0.02	0.09

砷 (ppm)	0.11	0.10	0.25
---------	------	------	------

实施例3

取新鲜桑枝（粤桑11号）1000kg，粉碎后，加4000L水，用加热回流法提取2h，合并提取液，过滤除去不溶物，得到粗提液。经测定，粗提液中重金属含量为40-80ppm，铅52 ppm，镉1.94 ppm，汞0.88 ppm，砷1.11 ppm。粗提液热浓缩至固形物含量达到4%，保温50℃作为阳离子树脂柱的上样液。

使用D113型大孔弱酸性苯乙烯系阳离子树脂150kg装柱，使用2mol/L的盐酸溶液洗至洗出液pH为4.5；使用1mol/L氢氧化钠溶液洗至洗出液pH为8.5；2mol/L的盐酸溶液洗至洗出液pH为4.5；再使用5倍柱体积的去离子水冲洗，完成活化。上样经浓缩处理的提取液，然后使用1000L 2.5mol/L氨水洗脱，洗脱速度为6BV/h，检测阳离子柱流出液的pH>7时收集洗脱液，当收集液达到900L时，停止收集，将收集液直接过阴离子柱纯化。

使用D218型大孔强碱性丙烯酸系阴离子树脂62.5kg装柱，使用1.5 mol/L氢氧化钠溶液洗至洗出液pH为9.0；使用1.5mol/L的盐酸溶液洗至洗出液pH为3.5；1.5 mol/L氢氧化钠溶液洗至洗出液pH为9.0；完成活化。将收集的阳离子树脂洗脱液上样至阴离子树脂，收集流出液至流出液达到870L结束。

将经过阴离子柱分离后得到的收集液进行微滤膜过滤除杂再用反离子渗透膜浓缩，浓缩后的液体比重为1.1，将其转移至醇沉罐内，搅拌桨400rpm下加入无水乙醇15kg。乙醇加入完毕后停止搅拌，醇沉24h，取上清液，减压浓缩得提取物浸膏。

另外取新鲜桑白皮和桑叶（粤桑11号）进行提取，提取方法和参数与上述方法相同，其中，由桑白皮和桑叶得到的粗提液的重金属含量均为40-80ppm，铅含量分别为48、53ppm，镉含量分别为1.78、1.77ppm，汞含量分别为0.77、0.78ppm，砷含量分别为0.87、0.95ppm。

得到的桑枝、桑白皮和桑叶提取物浸膏中的组分和重金属含量见表3。

表3 实施例3得到的植物提取物中的各组分含量和重金属含量

提取物 含量	桑枝 提取物	桑白皮 提取物	桑叶 提取物
生物碱%	75	67	50
多糖%	15	20	27
黄酮%	0.7	0.8	3
氨基酸%	5	6	16

生物碱中1-DNJ%	72	70	66
重金属总含量 (ppm)	< 5	< 5	< 5
铅 (ppm)	2.71	2.65	2.60
镉 (ppm)	0.03	0.06	0.05
汞 (ppm)	0.24	0.10	0.12
砷 (ppm)	0.72	0.45	0.50

实施例4

取晾干的桑白皮（桂桑优62号）1000kg，粉碎后，加10000L水，分2次加入，每次用加热回流法提取2.5h，合并提取液，过滤除去不溶物，得到粗提液。经测定，粗提液中重金属含量小于5ppm，铅1.57 ppm，镉0.23 ppm，汞0.09 ppm，砷0.58 ppm。粗提液先经微滤膜过滤除杂，然后用反离子渗透膜浓缩至固形物含量达到6%，作为阳离子树脂柱的上样液。

使用D001型大孔强酸性苯乙烯系阳离子树脂100kg装柱，按照实施例3的方法对阳离子树脂进行活化。上样经浓缩处理的提取液，然后使用500L 0.2mol/L氯化铵洗脱，洗脱速度为5BV/h，用20%硅钨酸检测流出液，当有白色沉淀生成时开始收集，当收集液达到200L时，停止收集，将收集液直接过阴离子柱纯化。

使用D201型大孔强碱性苯乙烯系阴离子树脂32kg装柱，按照实施例3的方法对阴离子树脂进行活化。将收集的阳离子树脂洗脱液上样至阴离子树脂，收集流出液至流出液达到100L结束。

将经过阴离子柱分离后得到的收集液进行热浓缩，浓缩后的液体比重为1.2，将其转移至醇沉罐内，搅拌桨350rpm下加入无水乙醇3kg。乙醇加入完毕后停止搅拌，醇沉24h，取上清液，减压浓缩得提取物浸膏。

另外取晾干的桑枝（桂桑优62号）进行提取，提取方法和参数与上述方法相同，其中，由桑枝得到的粗提液的重金属含量为5-10ppm，铅含量分别为1.66ppm，镉含量分别为0.25ppm，汞含量分别为0.07ppm，砷含量分别为0.60ppm。

得到的桑枝、桑白皮提取物浸膏中的组分和重金属含量见表4。

表4 实施例4得到的植物提取物中的各组分含量和重金属含量

提取物 含量	桑枝 提取物	桑白皮 提取物
-----------	-----------	------------

生物碱%	65	58
多糖%	16	20
黄酮%	0.7	0.5
氨基酸%	17	20
生物碱中1-DNJ%	69	68
重金属总含量 (ppm)	< 5	< 5
铅 (ppm)	0.08	0.04
镉 (ppm)	0.04	0
汞 (ppm)	0.01	0.01
砷 (ppm)	0.21	0.16

实施例5

取新鲜桑枝（桑特优2号）10kg，粉碎后，加150L水，分2次加入，每次用煎煮法提取3h，合并提取液，过滤除去不溶物。提取液热浓缩至固形物含量达到8%，将其转移至醇沉罐，搅拌桨300rpm下加入2367.9g无水乙醇（3L）。乙醇加入完毕后停止搅拌，醇沉24h，取上清液作为阳离子树脂柱的上样液。

使用002SC型强酸性苯乙烯系阳离子树脂5kg装柱，按照实施例3的方法对阳离子树脂进行活化。上样经浓缩醇沉处理的提取液，然后使用100L 5mol/L 氯化钾洗脱，洗脱速度为5BV/h，用20%硅钨酸检测流出液，当有白色沉淀生成时开始收集，当收集液达到25L时，停止收集，将收集液直接过阴离子柱纯化。

使用711型强碱性苯乙烯系阴离子树脂10kg装柱，按照实施例3的方法对阴离子树脂进行活化。将收集的阳离子树脂洗脱液上样至阴离子树脂，收集流出液至流出液达到15L结束。将收集液重新上样至阳离子树脂，按照上述方法依次用阳离子树脂和阴离子树脂再分离两次。

将经过三次柱分离后得到的收集液进行离心除杂再进行反离子渗透膜浓缩，浓缩后的液体比重为1.25，将其转移至醇沉罐内，搅拌桨1000rpm下加入无水乙醇125g。乙醇加入完毕后停止搅拌，醇沉24h，取上清液，减压浓缩得提取物浸膏。另外取新鲜桑白皮和桑叶（桑特优2号）进行提取，提取方法和参数与上述方法相同。得到的桑枝、桑白皮和桑叶提取物浸膏中的组分和重金属含量见表5。

表5 实施例5得到的植物提取物中的各组分含量和重金属含量

含量 \ 提取物	桑枝 提取物	桑白皮 提取物	桑叶 提取物
生物碱%	98	95	90
多糖%	0.2	2	4
黄酮%	0.05	0.1	0.1
氨基酸%	0	1	3
生物碱中1-DNJ%	99	96	91
重金属总含量 (ppm)	< 5	< 5	< 5
铅 (ppm)	0.06	0.05	0.07
镉 (ppm)	0	0	0
汞 (ppm)	0	0	0.01
砷 (ppm)	0.16	0.12	0.15

实施例6

取新鲜桑树根（粤桑11号）1kg，粉碎后，加6L醇水，分3次加入，每次用超声提取法提取1h，合并提取液，过滤除去不溶物，得到粗提液。粗提液作为阳离子树脂柱的上样液。

使用D254型大孔强碱性季铵型阳离子树脂1kg装柱，按照实施例3的方法对阳离子树脂进行活化。上样粗提液，然后使用15L 3mol/L 氯化钠洗脱，洗脱速度为5BV/h，用20%硅钨酸检测流出液，当有白色沉淀生成时开始收集，当收集液达到5L时，停止收集，将收集液直接过阴离子柱纯化。

使用D301型大孔弱碱性苯乙烯系阴离子树脂1kg装柱，按照实施例3的方法对阴离子树脂进行活化。将收集的阳离子树脂洗脱液上样至阴离子树脂，收集流出液至流出液达到5L结束。将收集液重新上样至阳离子树脂，按照上述方法依次用阳离子树脂和阴离子树脂再次分离。

将经过两次柱分离后得到的收集液进行离心除杂再经反离子渗透膜浓缩，浓缩后的液体比重为1.2，将其转移至醇沉罐内，搅拌桨600rpm下加入无水乙醇6.3g。乙醇加入完毕后停止搅拌，醇沉24h，取上清液，减压浓缩得提取物浸膏。另外取新鲜桑枝、桑叶（粤桑11号）进行提取，提取方法和参数与上述方法相同。得到的桑枝、桑叶和桑树根提取物浸膏中的组分和重金属含量见表6。

表6 实施例6得到的植物提取物中的各组分含量和重金属含量

含量 \ 提取物	桑枝 提取物	桑叶 提取物	桑树根 提取物
生物碱%	97	85	92
多糖%	0.3	5	3
黄酮%	0.06	0.3	0.1
氨基酸%	0	5	2
生物碱中1-DNJ%	98	83	95
重金属总含量(ppm)	<5	<5	<5
铅(ppm)	0.05	0.03	0.05
镉(ppm)	0	0	0
汞(ppm)	0	0.02	0
砷(ppm)	0.13	0.14	0.14

实施例7

取新鲜桑枝（广东桑）1000kg，粉碎后，加11500L水，加热回流提取2h，合并提取液，过滤除去不溶物，得到粗提液。粗提液先经离心除杂，再用反离子渗透膜浓缩至固形物含量达到1%，作为阳离子树脂柱的上样液。

使用D001型大孔强酸性苯乙烯系阳离子树脂150kg装柱，按照实施例3的方法对阳离子树脂进行活化。上样经浓缩处理的粗提液，使用5000L 0.04mol/L硝酸铵洗脱，洗脱速度为5BV/h，用20%硅钨酸检测流出液，当有白色沉淀生成时开始收集，当收集液达到1000L时，停止收集。

将经过阳离子柱分离后得到的收集液进行纳滤膜浓缩，浓缩后的液体比重为1.3，将其转移至醇沉罐内，搅拌桨600rpm下加入无水乙醇1.7kg。乙醇加入完毕后停止搅拌，醇沉24h，取上清液，减压浓缩得提取物浸膏。

另外取新鲜桑白皮和桑叶（广东桑）进行提取，提取方法和参数与上述方法相同。得到的桑枝、桑白皮和桑叶提取物浸膏中的组分和重金属含量见表7。

表7 实施例7得到的植物提取物中的各组分含量和重金属含量

含量 \ 提取物	桑枝 提取物	桑白皮 提取物	桑叶 提取物
含量			

生物碱%	15	10	8
多糖%	40	42	45
黄酮%	0.7	0.8	0.6
氨基酸%	40	41	43
生物碱中1-DNJ%	55	50	49
重金属总含量 (ppm)	< 5	< 5	< 5
铅 (ppm)	0.12	0.10	0.09
镉 (ppm)	0	0	0
汞 (ppm)	0.02	0.02	0.01
砷 (ppm)	0.18	0.11	0.15

实施例8

取新鲜桑枝（粤桑11号）1000kg，粉碎后，加8000L水，分2次加入，每次用煎煮法提取2h，合并提取液，过滤除去不溶物，得到粗提液。粗提液先经微滤膜过滤除杂，然后用反离子渗透膜浓缩至固形物含量达到1%，作为阳离子树脂柱的上样液。

使用732型强酸性苯乙烯系阳离子树脂41.7kg装柱，按照实施例3的方法对阳离子树脂进行活化。上样粗提液，然后使用1000L 0.1mol/L 氯化钠洗脱，洗脱速度为5BV/h，用20%硅钨酸检测流出液，当有白色沉淀生成时开始收集，当收集液达到500L时，停止收集。

将经过阳离子柱分离后得到的收集液进行纳滤膜浓缩，浓缩后的液体比重为1.25，将其转移至醇沉罐内，搅拌浆600rpm下加入无水乙醇15kg。乙醇加入完毕后停止搅拌，醇沉24h，取上清液，减压浓缩得提取物浸膏。

另外取新鲜桑白皮和桑叶（粤桑11号）进行提取，提取方法和参数与上述方法相同。得到的桑枝、桑白皮和桑叶提取物浸膏中的组分和重金属含量见表8。

表8 实施例8得到的植物提取物中的各组分含量和重金属含量

含量 \ 提取物	桑枝 提取物	桑白皮 提取物	桑叶 提取物
生物碱%	10	8	5
多糖%	44	50	60

黄酮%	1	1.2	2
氨基酸%	41	37	30
生物碱中1-DNJ%	54	45	46
重金属总含量 (ppm)	< 5	< 5	< 5
铅 (ppm)	0.55	0.30	0.43
镉 (ppm)	0.02	0.01	0.02
汞 (ppm)	0.03	0.01	0.01
砷 (ppm)	0.11	0.10	0.12

实施例9

取新鲜桑枝（广东桑）100g，粉碎后，加600ml水，加热回流提取1h，过滤除去不溶物，得到粗提液。粗提液先经热浓缩至固形物含量达到5%，作为阳离子树脂柱的上样液。

使用732型强酸性苯乙烯系阳离子树脂3.85g装柱，按照实施例3的方法对阳离子树脂进行活化。上样粗提液，然后使用700mL 0.15mol/L氯化铵洗脱，洗脱速度为5BV/h，用20%硅钨酸检测流出液，当有白色沉淀生成时开始收集，当收集液达到100mL时，停止收集。

将经过阳离子柱分离后得到的收集液进行热浓缩，浓缩后的液体比重为1.3，将其转移至醇沉罐内，搅拌桨600rpm下加入无水乙醇25g。乙醇加入完毕后停止搅拌，醇沉24h，取上清液，减压浓缩得提取物浸膏。

另外取新鲜桑白皮和桑叶（广东桑）进行提取，提取方法和参数与上述方法相同。得到的桑枝、桑白皮和桑叶提取物浸膏中的组分和重金属含量见表9。

表9 实施例9得到的植物提取物中的各组分含量和重金属含量

含量 \ 提取物	桑枝 提取物	桑白皮 提取物	桑叶 提取物
生物碱%	8	5	3
多糖%	45	48	50
黄酮%	1.5	2	3
氨基酸%	40	40	41
生物碱中1-DNJ%	44	40	38

重金属总含量 (ppm)	< 5	< 5	< 5
铅 (ppm)	0.70	0.67	0.60
镉 (ppm)	0.01	0.02	0.01
汞 (ppm)	0.01	0.02	0.01
砷 (ppm)	0.14	0.10	0.11

实施例10

取新鲜桑枝（桑特优2号）1000kg，粉碎后，加5000L水，加热回流提取1h，过滤除去不溶物，得到粗提液。粗提液先经热浓缩至固形物含量达到10%，作为阳离子树脂柱的上样液。

使用D254大孔强碱性季铵型阳离子树脂3.5g装柱，按照实施例3的方法对阳离子树脂进行活化。上样粗提液，然后使用200L 0.15mol/L 氯化钾洗脱，洗脱速度为5BV/h，用20%硅钨酸检测流出液，当有白色沉淀生成时开始收集，当收集液达到100L时，停止收集。

将经过阳离子柱分离后得到的收集液进行热浓缩，浓缩后的液体比重为1.05，将其转移至醇沉罐内，搅拌机600rpm下加入无水乙醇15kg。乙醇加入完毕后停止搅拌，醇沉24h，取上清液，减压浓缩得提取物浸膏。

另外取新鲜桑白皮（桑特优2号）进行提取，提取方法和参数与上述方法相同。得到的桑枝、桑白皮提取物浸膏中的组分和重金属含量见表10。

表10 实施例10得到的植物提取物中的各组分含量和重金属含量

含量 \ 提取物	桑枝 提取物	桑白皮 提取物
生物碱%	5	3
多糖%	47	50
黄酮%	2	3
氨基酸%	41	41
生物碱中1-DNJ%	47	43
重金属总含量 (ppm)	< 5	< 5
铅 (ppm)	0.24	0.27
镉 (ppm)	0	0
汞 (ppm)	0.01	0.02

砷 (ppm)	0.12	0.14
---------	------	------

实施例11

取新鲜桑枝（山桑）1000g，粉碎后，加10L酸水，分3次加入，每次超声提取2h，过滤除去不溶物，得到粗提液。粗提液先经微滤膜过滤除杂再用反离子渗透膜浓缩至固形物含量达到4%，作为阳离子树脂柱的上样液。

使用D001型大孔强酸性苯乙烯系阳离子树脂66.67g装柱，按照实施例3的方法对阳离子树脂进行活化。上样粗提液，然后使用12L 1.5mol/L 氨水洗脱，洗脱速度为5BV/h，用高效液相色谱法检测阳离子柱流出液中含有生物碱时收集洗脱液，当收集液达到100mL时，停止收集。将收集液直接过阴离子柱纯化。

使用D218型大孔强碱性苯乙烯系阴离子树脂13.3g装柱，按照实施例3的方法对阴离子树脂进行活化。将收集的阳离子树脂洗脱液上样至阴离子柱，收集流出液至流出液达到50ml结束。

将经过阴离子柱分离后得到的收集液先经微滤膜过滤除杂再用反离子渗透膜浓缩，浓缩后的液体比重为1.15，将其转移至醇沉罐内，搅拌浆600rpm下加入无水乙醇25g。乙醇加入完毕后停止搅拌，醇沉24h，取上清液，减压浓缩得提取物浸膏。

另外取新鲜桑白皮和桑叶（山桑）进行提取，提取方法和参数与上述方法相同。得到的桑枝、桑白皮和桑叶提取物浸膏中的组分和重金属含量见表11。

表11 实施例11得到的植物提取物中的各组分含量和重金属含量

提取物 含量	桑枝 提取物	桑白皮 提取物	桑叶 提取物
生物碱%	30	30	15
多糖%	31	34	40
黄酮%	3	2	1
氨基酸%	30	28	39
生物碱中1-DNJ%	58	55	53
重金属总含量(ppm)	<5	<5	<5
铅 (ppm)	0.26	0.30	0.25
镉 (ppm)	0.01	0.02	0.01

汞 (ppm)	0.01	0	0.02
砷 (ppm)	0.11	0.12	0.13

实施例12

取新鲜桑白皮（桂桑优62号）100g，粉碎后，加1.2L醇水，用煎煮法提取1h，过滤除去不溶物，得到粗提液。粗提液先经热浓缩至固形物含量达到8%，作为阳离子树脂柱的上样液。

使用734型强酸性苯乙烯系阳离子树脂33.34g装柱，按照实施例3的方法对阳离子树脂进行活化。上样粗提液，然后使用50mL 2.5mol/L氨水洗脱，洗脱速度为5BV/h，检测阳离子柱流出液的pH>7时收集洗脱液，当收集液达到10mL时，停止收集。

将经过阳离子柱分离后得到的收集液进行离心除杂，然后用反离子渗透膜进行浓缩，浓缩后的液体比重为1.2，将其转移至醇沉罐内，搅拌桨600rpm下加入无水乙醇15g。乙醇加入完毕后停止搅拌，醇沉24h，取上清液，减压浓缩得提取物浸膏。

得到的桑白皮提取物浸膏中，生物碱的含量为15%，多糖的含量为38%，黄酮的含量为2%，氨基酸的含量为40%。在生物碱中，1-DNJ的含量为52%。

重金属总含量小于5ppm，铅含量0.29ppm，镉0ppm，汞0.02ppm，砷0.10ppm。

实施例13

取新鲜桑枝（白桑）100g，粉碎后，加300ml碱水，加热回流提取0.5h，过滤除去不溶物，得到粗提液。粗提液先经离心除杂再用反离子渗透膜浓缩至固形物含量达到6%，作为阳离子树脂柱的上样液。

使用732型强酸性苯乙烯系阳离子树脂3.34g装柱，按照实施例3的方法对阳离子树脂进行活化。上样粗提液，然后使用3L 1.0mol/L氨水洗脱，洗脱速度为5BV/h，用20%硅钨酸检测流出液，当有白色沉淀生成时开始收集，当收集液达到400mL时，停止收集。

将经过阳离子柱分离后得到的收集液进行热浓缩，浓缩后的液体比重为1.25，将其转移至醇沉罐内，搅拌桨600rpm下加入无水乙醇5g。乙醇加入完毕后停止搅拌，醇沉24h，取上清液，减压浓缩得提取物浸膏。

得到的桑枝提取物浸膏中，生物碱的含量为3%，多糖的含量为60%，黄酮的含量为5%，氨基酸的含量为30%。在生物碱中，1-DNJ的含量为47%。

重金属总含量小于5ppm，铅含量0.31ppm，镉0ppm，汞0.01ppm，砷

0.14ppm。

实施例14

取新鲜桑叶（鲁桑）100g，粉碎后，加500ml醇水，用煎煮法提取0.5h，过滤除去不溶物，得到粗提液。粗提液经纳滤膜浓缩至固形物含量达到12%，作为阳离子树脂柱的上样液。

使用732型强酸性苯乙烯系阳离子树脂25g装柱，按照实施例3的方法对阳离子树脂进行活化。上样粗提液，然后使用2L 2.0mol/L氨水洗脱，洗脱速度为5BV/h，用高效液相色谱法检测阳离子柱流出液中含有生物碱时收集洗脱液，当收集液达到800mL时，停止收集。

将经过阳离子柱分离后得到的收集液进行热浓缩，浓缩后的液体比重为1.14，将其转移至醇沉罐内，搅拌桨600rpm下加入无水乙醇5g。乙醇加入完毕后停止搅拌，醇沉24h，取上清液，减压浓缩得提取物浸膏。

得到的桑叶提取物浸膏中，生物碱的含量为10%，多糖的含量为43%，黄酮的含量为1%，氨基酸的含量为37%。在生物碱中，1-DNJ的含量为50%。

重金属总含量小于5ppm，铅含量0.33ppm，镉0.01ppm，汞0.02ppm，砷0.15ppm。

实施例15

取新鲜风信子（*Hyacinthus orientalis*）鳞茎100g，粉碎后，加700ml水，分2次加入，每次超声提取0.5h，合并提取液，过滤除去不溶物，得到粗提液。粗提液经纳滤膜浓缩至固形物含量达到10%，作为阳离子树脂柱的上样液。

使用732型强酸性苯乙烯系阳离子树脂3.5g装柱，按照实施例3的方法对阳离子树脂进行活化。上样经浓缩处理的粗提液，使用10ml 1.75mol/L氢氧化钠溶液洗脱，洗脱速度为10BV/h，检测阳离子柱流出液的pH>7时收集洗脱液，当收集液达到10ml时，停止收集，将收集液直接过阴离子柱纯化。

使用D218型大孔强碱性苯乙烯系阴离子树脂4g装柱，按照实施例3的方法对阴离子树脂进行活化。将收集的阳离子树脂洗脱液上样至阴离子树脂，收集流出液至流出液达到5ml结束。

将经过阴离子柱分离后得到的收集液进行热浓缩，浓缩后的液体比重为1.1，将其转移至醇沉罐内，搅拌桨100rpm下加入无水乙醇0.4g。乙醇加入完毕后停止搅拌，醇沉24h，取上清液，真空干燥，得风信子鳞茎提取物。

风信子鳞茎提取物中，生物碱的含量为3%，多糖的含量为68%，黄酮的含量为2%，氨基酸的含量为25%。

在生物碱中，1-DNJ的含量为30%。

重金属总含量小于5ppm，铅含量0.08ppm，镉未检出，汞0.01ppm，砷0.15ppm。

实施例16

取新鲜鸭跖草 (*Commelina communis*) 叶片100g，粉碎后，加500ml 醇水，分2次加入，每次加热回流提取1h，合并提取液，过滤除去不溶物。提取液经热浓缩至固形物含量达到10%，保温30℃作为阳离子树脂柱的上样液。

使用732型强酸性苯乙烯系阳离子树脂3.5g装柱，按照实施例3的方法对阳离子树脂进行活化。上样经浓缩处理的提取液，然后使用800ml 2.3 mol/L 氨水洗脱，洗脱速度为10BV/h，检测阳离子柱流出液的pH>7时收集洗脱液，当收集液达到300ml时，停止收集。

将经过阳离子柱分离后得到的收集液进行超滤膜过滤除杂，再用反离子渗透膜浓缩，浓缩后的液体比重为1.2，将其转移至醇沉罐内，搅拌浆500rpm下加入无水乙醇5g。乙醇加入完毕后停止搅拌，醇沉24h，取上清液，真空干燥，得鸭跖草叶片提取物。

鸭跖草叶片提取物中，生物碱的含量为10%，多糖的含量为27%，黄酮的含量为10%，氨基酸的含量为50%。

在生物碱中，1-DNJ的含量为50%。

重金属总含量小于5ppm，铅含量0.05ppm，镉未检出，汞未检出，砷0.17ppm。

对比例1

取与实施例3相同批次的新鲜桑枝（细齿桑）1000kg，按照实施例3的方法进行粗提，粗提液经热浓缩处理，浓缩后的液体比重为1.1，将其转移至醇沉罐内，搅拌浆400rpm下加入无水乙醇62kg。乙醇加入完毕后停止搅拌，醇沉24h，取上清液，减压浓缩得桑枝提取物浸膏。其中，生物碱的含量为15%，多糖的含量为40%，黄酮的含量为5.2%，氨基酸的含量为30%。

在生物碱中，1-DNJ的含量为55%。

重金属总含量为30-40ppm，铅含量29.11ppm，镉1.50ppm，汞0.76ppm，砷1.01ppm，铅、镉、汞含量超标。

该对比例去掉阳离子柱和阴离子柱分离步骤后，与实施例3相比，生物碱含量降低，重金属含量明显升高，且乙醇用量增加了3倍。

对比例2

取与实施例3相同批次的新鲜桑枝（细齿桑）1000kg，按照实施例3的方法进行粗提、热浓缩、过阳离子树脂和阴离子树脂分离，将经阴离子柱分离

后得到的870L收集液转移至醇沉罐内，搅拌桨400rpm下加入无水乙醇135kg。乙醇加入完毕后停止搅拌，醇沉24h，取上清液浓缩，减压浓缩得桑枝提取物浸膏。其中，生物碱的含量为62%，多糖的含量为18%，黄酮的含量为1.1%，氨基酸的含量为12%。

在生物碱中，1-DNJ的含量为68%。

重金属总含量为10-20ppm，铅含量10.01ppm，镉0.70ppm，汞0.44ppm，砷0.83ppm，铅、镉、汞超标。

该对比例在树脂分离之后醇沉之前没有浓缩步骤，与实施例3相比，重金属含量升高，且乙醇用量增加了8倍。

对比例3

取与实施例3相同批次的新鲜桑枝（细齿桑）1000kg，按照实施例3的方法进行粗提、加热浓缩并过阳离子树脂和阴离子树脂分离，将经阴离子柱分离后得到的870L收集液进行减压浓缩得桑枝提取物浸膏，其中，生物碱的含量为52%，多糖的含量为22%，黄酮的含量为0.8%，氨基酸的含量为20%。

在生物碱中，1-DNJ的含量为60%。

重金属总含量为20-40ppm，铅含量22.15ppm，镉1.45ppm，汞0.65ppm，砷0.89ppm，铅、镉和汞含量超标。

该对比例在树脂分离之后去掉醇沉步骤，与实施例3相比，生物碱含量降低，重金属含量明显升高。

对比例4

取与实施例3相同批次的新鲜桑枝（细齿桑）1000kg，粉碎后，加4倍醇水（4000L），用加热回流法提取2h，合并提取液，过滤除去不溶物，将粗提液进行热浓缩，浓缩后的液体比重为1.1，将其转移至醇沉罐内，搅拌桨400rpm下加入无水乙醇62kg。乙醇加入完毕后停止搅拌，醇沉24h，取上清液上样至阳离子树脂，按照实施例3的方法使用阳离子树脂150kg装柱，进行分离以及阴离子树脂分离，将经阴离子柱分离后得到的收集液减压浓缩得桑枝提取物浸膏。其中，生物碱的含量为51%，多糖的含量为25%，黄酮的含量为0.5%，氨基酸的含量为20%。

在生物碱中，1-DNJ的含量为55%。

重金属总含量为10-20ppm，铅含量11.11ppm，镉0.82ppm，汞0.50ppm，砷0.53ppm，铅、镉、汞超标。

该对比例在阳离子树脂分离步骤之前进行醇沉，与实施例3相比，生物碱含量降低，重金属含量升高，且乙醇用量增加了3倍。

对比例5

取与实施例3相同批次的新鲜桑枝（细齿桑）1000kg，按照实施例3的方法进行粗提、热浓缩，将浓缩后的粗提液直接上样至阴离子树脂，按照实施例3的方法进行阴离子树脂分离，收集流出液3000L，将经过阴离子柱分离后得到的收集液进行离心除杂再进行纳滤膜浓缩，浓缩后的液体比重为1.1，将其转移至醇沉罐内，搅拌桨400rpm下加入无水乙醇46kg。乙醇加入完毕后停止搅拌，醇沉24h，取上清液浓缩，减压浓缩得桑枝提取物浸膏。

桑枝提取物浸膏中，生物碱的含量为40%，多糖的含量为35%，黄酮的含量为1.5%，氨基酸的含量为22%。

在生物碱中，1-DNJ的含量为50%。

重金属总含量为30-40ppm，铅含量30.01ppm，镉1.24ppm，汞0.21ppm，砷0.85ppm，铅、镉和汞含量超标。

该对比例去掉了阳离子树脂分离步骤，与实施例3相比，生物碱含量降低，重金属含量明显升高，且乙醇用量增加了2倍。

试验例1 稳定性研究

取实施例1制得的桑葚提取物、实施例2、8、9制得的桑叶提取物、实施例3、5-7的桑枝提取物以及实施例4和10的桑白皮提取物，复合膜袋密封包装后，在温度为25℃±2℃，相对湿度RH60%±10%的条件下放置24个月后，检测其中生物碱的含量，结果见下表1：

表1：

项目 \ 含量/%	实施例1 桑葚 提取物	实施例2 桑叶 提取物	实施例3 桑枝 提取物	实施例4 桑白 皮提 取物	实施例5 桑枝 提取物	实施例6 桑枝 提取物	实施例7 桑枝 提取物	实施例8 桑叶 提取物	实施例9 桑叶 提取物	实施例10 桑白 皮提 取物
总生物碱	44.8	59.5	74.3	57.2	97.2	96.7	14.8	4.9	2.9	2.9
1-DNJ	59.4	68.8	71.3	66.9	98.1	97.5	54.9	45.7	37.7	42.8

由上表1可知，采用本发明的提取方法得到的植物提取物稳定性好。

试验例2 有机溶剂残留量

采用气相色谱法进行树脂残留检测，包括：正己烷、甲基环己烷、二乙

烯苯、甲苯、苯、二甲苯、苯乙烯，对实施例1-9制得的植物提取物进行检测，树脂残留均未检出。

试验例3 疗效试验

取正常雄性ICR小鼠，按体重随机均分为6组（n=10），实验前禁食过夜，一组口服蔗糖溶液（4.0 g/kg）作为对照组（Normal），其余5组分别口服蔗糖与实施例1制得的桑白皮提取物、实施例2制得的桑叶提取物、实施例3、5、6中的桑枝提取物样品（以总生物碱计均为10 mg/kg）作为给药组，测定给药前（0 min）及给药后30 min、60 min、120 min时的血糖值，绘制血糖随时间变化曲线，并计算血糖曲线下面积（AUC），结果见图1。

结果表明，采用本发明植物提取方法获得的植物提取物能使正常小鼠蔗糖负荷后血糖升高明显降低。

以上结合了优选的实施方式对本发明进行了说明，不过这些实施方式仅是范例性的，仅起到说明性的作用。在此基础上，可以对本发明进行多种替换和改进，这些均落入本发明的保护范围内。