

蚕沙叶绿素提取及合成脱镁叶绿酸工艺改进研究

康玲^{1a}, 吴真², 丛媛媛^{1b} (1.新疆医科大学, a.公共卫生学院; b.药学院, 乌鲁木齐 830011; 2.首都医科大学附属北京友谊医院中药剂科, 北京 100050)

摘要: 目的 探讨不同提取工艺对蚕沙中提取叶绿素及制取叶绿素衍生物脱镁叶绿酸的影响, 以提高蚕沙叶绿素及叶绿素衍生物的制备量。方法 单因素实验设计, 以蚕沙软化时间(含水量)、不同提取溶剂为考察条件, 优化蚕沙叶绿素提取工艺, 并探讨浓盐酸脱镁时间对叶绿素合成脱镁叶绿酸制备率的影响。结果 蚕沙软化时间 2 h (含水量 26%)、丙酮:乙醇体积比 1:1 做溶剂为提取叶绿素的最佳条件, 提取率提高到 1.43%。以蚕沙叶绿素粗品合成叶绿素衍生物脱镁叶绿酸, 浓盐酸脱镁搅拌反应 72 h 制备率达 670 mg·g⁻¹。结论 通过改良工艺, 提高了蚕沙叶绿素及其衍生物脱镁叶绿酸的提取制备率。

关键词: 蚕沙; 叶绿素; 脱镁叶绿酸

中图分类号: R284.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2012)08-0700-03

Improvement on Extraction of Chlorophyll and Synthesis of Pheophorbide from Silkworm Excrement

KANG Ling^{1a}, WU Zhen², CONG Yuanyuan^{1b} (1.Xinjiang Medical University, a.College of Public Health; b.College of Pharmacy, Urumqi 830011, China; 2.Beijing Friendship Hospital Affiliate of Capital University of Medical Sciences, Beijing 100050, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the influence of different extraction technologies on the extraction of chlorophyll and chlorophyll derivatives from silkworm excreta in order to improve the yield. **METHODS** The extraction technology of chlorophyll from silkworm excrement was optimized with softening time and different solvents using single factor experiments design. The effects of magnesium removal time with hydrochloric acid on yield of pheophorbide from chlorophyll have been investigated. **RESULTS** In the present study, the optimized extraction technology of chlorophyll from silkworm excrement was as follows: the softening time of silkworm excrement was 2 h (26% of water content), and the extraction solvent was 1:1 of acetone: ethanol. The production rate of chlorophyll was 1.43%. The preparation parameters of pheophorbide from chlorophyll were removing magnesium with hydrochloric acid for 72 hours. The yield of pheophorbide was 670 mg·g⁻¹. **CONCLUSION** The rate of production of chlorophyll and pheophorbide from silkworm excrement has been increased by improving extraction technology.

KEY WORDS: silkworm excrement; chlorophyll; pheophorbide

蚕沙(*Bombyx mori* L.), 又名蚕砂即蚕粪, 是蚕蛾科昆虫家蚕(桑蚕)幼虫的干燥粪便。蚕食桑叶后消耗了桑叶中的部分蛋白质、糖类和脂肪类物质, 而大部分有效成分随粪便排泄到体外, 是蚕业的主要副产物之一。蚕沙含有多种成分, 具有较高的营养和药用价值^[1-2]。现代医药学研究表明蚕沙中叶绿素含量丰富, 约为 0.8%~1.0%, 远远高于绿色蔬菜及其它绿色植物, 叶绿素目前广泛应用于食品着色、饮料、化妆品、医疗保健等行业。叶绿素在光、热、酸及碱等作用下生成的降解产物及其衍生物具有抗肿瘤、杀菌、抗诱变、保肝、抗溃疡等多方面的生物活性^[3-5]。我国养蚕业历史十分悠久, 是世界蚕业的发源地和主产国,

蚕沙资源十分丰富, 仅全国五大蚕区干蚕沙的年产量就达 100 万吨以上^[6-7]。利用蚕业副产物蚕沙提取叶绿素并合成叶绿素衍生物不仅可以使其变废为宝, 而且对蚕沙农副产品开发也具有重要的现实意义和社会意义。本研究以对蚕沙提取叶绿素影响较大的因素蚕沙软化时间、丙酮量为切入点, 通过实验寻求提高蚕沙叶绿素提取和脱镁叶绿酸制备的工艺, 以期提高叶绿素提取率和脱镁叶绿酸的制备量。

1 材料与方法

1.1 仪器

721 紫外分光光度计(上海光学仪器厂); 旋转蒸发器、电磁搅拌器(上海仪表厂); 电热恒温水浴

基金项目: 新疆教育厅高校科研计划基金(XJEDU2009S62); 新疆科技厅新疆地方病分子生物学重点实验室开放课题(XJDX0208-2009-07); 国家自然科学基金(81060186)

作者简介: 康玲, 女, 博士, 副教授 Tel: (0991)4362474 E-mail: lingkang1220@sina.com

锅(北京长安科学仪器厂);布氏漏斗(江苏泰兴市盛达实验仪器经营部);真空干燥器(上海禾气玻璃仪器有限公司)。

1.2 试剂

无水乙醇、丙酮、氯仿、乙醚、浓盐酸、碳酸钠、无水硫酸钠等试剂均为试剂纯,购自北京试剂公司。

1.3 实验方法

1.3.1 干蚕沙软化 拣去干蚕沙(产自江苏)中杂质,准确称取 100 g 置 160 目不锈钢筛网上用蒸馏水冲洗,边冲洗边用手轻搓揉,洗好蚕沙装入 500 mL 烧杯中轻轻压实,倒扣在筛网上空去多余水分,分别软化 0.5, 1.5 和 2.0 h,测定其含水量。

1.3.2 叶绿素提取分离 软化后的蚕沙装入 1 000 mL 圆底烧瓶,添加沸石 3~4 粒,不同体积比例丙酮:乙醇为溶剂,添加量为蚕沙量的 4~5 倍,水浴锅上加热回流一定时间,待温度降到 50 ℃时趁热抽滤,滤渣用不同比例丙酮:乙醇 3~4 倍量加热回流提取,并趁热过滤,合并滤液,用旋转蒸发器回收滤液,得叶绿素提取液,定容至 100 mL。

1.3.3 叶绿素含量测定 准确吸取叶绿素提取溶液 2.5 mL,稀释,分别测定 645 nm 和 663 nm 处的吸光度。并根据数据按 Arnon 公式计算蚕沙中叶绿素的含量。计算公式为 $C_a=12.7A_{663}-2.69A_{645}$, $C_b=22.9A_{645}-4.68A_{663}$, $C_t=C_a+C_b$ (式中 C_a , C_b , C_t 分别为叶绿素 a、叶绿素 b 的浓度及叶绿素总浓度,单位为 $mg\cdot L^{-1}$)^[8]。

1.3.4 脱镁叶绿酸合成 叶绿素提取液在真空干燥器内处理 48 h 得叶绿素粗品,准确称取叶绿素粗品 2 g,40 mL 乙醚溶解后加入 36%盐酸 100 mL,置电磁搅拌器上搅拌($750\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$),室温反应不同时间,加入 200 mL 蒸馏水,并用 10%碳酸钠水溶液调 pH 至 5~6,静置 4 h,分液漏斗分去下层水,乙醚层经无水硫酸钠脱水后用旋转蒸发器回收溶剂。反应中冲入氮气以赶走氧气与氧气隔绝。

1.3.5 叶绿色素脱镁终点检测及脱镁叶绿酸制备率计算 精密量取待测溶液 3.5 mL,用铬黑 T 作终点指示剂,0.000 3 mol·L⁻¹ EDTA 滴定至终点,计算脱镁叶绿酸制备率^[9]。

2 结果

2.1 干蚕沙软化后含水量对叶绿素提取率的影响

干蚕沙粒径 1.5~3.0 mm,含水量在 8%~11% 之间。干蚕沙软化后,用手轻轻捏,感觉无硬芯,

又有一定弹性,但挤不出水来。本研究考察了蚕沙软化后含水量对叶绿素提取率的影响。在本实验条件下,随着软化时间的延长,叶绿素提取率逐渐增加。蚕沙软化 2 h,含水量 26.20%时叶绿素提取率为 1.23%,结果见表 1。

表 1 干蚕沙软化后含水量对叶绿素提取率的影响

Tab 1 The effect of silkworm excrement softening time on extraction rate of chlorophyll

分组	软化时间/h	含水量/%	溶剂	加热回流时间/h			叶绿素提取率/%
				第 1 次	第 2 次	第 3 次	
1	0.5	16.03	丙酮	1.5	1.0	0.5	0.80
2	1.5	21.80	丙酮	1.5	1.0	0.5	1.12
3	2.0	26.20	丙酮	1.5	1.0	0.5	1.23

2.2 不同溶剂对叶绿素提取率的影响

以软化 2 h、含水量 26%的蚕沙为原料,比较丙酮、乙醇及丙酮乙醇混合溶剂为提取剂对提取蚕沙叶绿素的影响,结果见表 2。由结果可知,仅以乙醇或丙酮做提取溶剂时叶绿素提取率分别为 0.96%和 1.23%,当以丙酮:乙醇=1:1 为提取液叶绿素提取率可达 1.43%。

表 2 不同提取溶剂对叶绿素提取率的影响

Tab 2 The effect of extraction solvent on extraction rate of chlorophyll

分组	溶剂	加热回流时间/h			叶绿素提取率/%
		第 1 次	第 2 次	第 3 次	
1	乙醇	1.5	1.0	0.5	0.96
2	丙酮	1.5	1.0	0.5	1.23
3	丙酮:乙醇(1:1)	1.5	1.0	0.5	1.43

2.3 盐酸脱镁反应时间对脱镁叶绿酸合成的影响

叶绿素在强酸条件下脱镁离子可生成脱镁叶绿酸。本实验研究结果显示,随着脱镁反应时间的延长,脱镁叶绿酸合成量逐渐增加。当经过 72 h 的浓盐酸脱镁离子后,脱镁叶绿酸的制备率达到 67%,结果见表 3。

表 3 浓盐酸脱镁时间对合成脱镁叶绿酸的影响

Tab 3 The effect of magnesium removal time on synthesis rate of pheophorbide

分组	叶绿素/g	浓盐酸/mL	搅拌反应时间/h	脱镁叶绿酸/g	制备率/%
1	2	100	10	0.36	18
2	2	100	20	0.42	21
3	2	100	30	0.74	37
4	2	100	40	1.16	58
5	2	100	72	1.34	67

3 讨论

蚕沙叶绿素提取方法包括传统的有机溶剂萃取-索式法、碱液法及新近发展的超临界 CO₂ 流体萃取法、超声或微波辅助提取法。提取的一般工艺流程为蚕沙除杂-软化-萃取-过滤-浓缩-提取-合成叶绿素衍生物^[10]。国内学者王章阳、潘慧娟等对提取工艺进行研究发现蚕沙软化用水量、提取溶剂丙酮含量对提取蚕沙中叶绿素及其制备脱镁叶绿酸有较大影响^[9,11]。溶剂浸取叶绿素的过程是溶剂将蚕沙中叶绿素溶解出来的过程,为保证溶剂能顺利进到蚕沙内部,需要先将蚕沙用水软化,软化好的蚕沙用手轻捏就散,但挤不出水来。本研究首先探讨了蚕沙软化时间对叶绿素提取率的影响。随着软化时间延长,蚕沙的含水量逐渐提高,叶绿素的提取率也随之增加。用本试验中最佳软化条件,即软化 2 h 的蚕沙(含水量在 26%左右),进行叶绿素提取,考察提取溶剂丙酮含量对提取叶绿素的影响,当丙酮:乙醇=1:1 时,叶绿素提取率提高到 1.43%,比近年来报道的超声或微波辅助等方法进一步提高^[12-13]。

在制备脱镁叶绿酸的过程中,卟啉环中心的 Mg²⁺在强酸性条件下被 H⁺从叶绿素分子中取代而游离在水溶液中,EDTA 是良好的 Mg²⁺络合剂,用铬黑 T 作终点指示剂,配位滴定方法测定取代的 Mg²⁺量可间接反映脱镁叶绿酸的产率。本研究中发现随着浓盐酸脱镁时间的延长,脱镁叶绿酸产率逐渐增加,故可通过适当延长脱镁时间提高脱镁叶绿酸的产量。

REFERENCES

[1] LIM D S, KO S H, LEE W Y. Silkworm-pheophorbide alpha

- mediated photodynamic therapy against B16F10 pigmented melanoma [J]. J Photochem Photobiol B, 2004, 74(1): 1-6.
- [2] NAOKI A, ROBERT J N, RUSSELL J M, et al. Sugar-mimic glycosidase inhibitors: natural occurrence, biological activity and prospects for therapeutic application [J]. Tetrahedron: Asymmetry, 2000, 11(8): 1645-1680.
- [3] ZHENG G D, OU Y W, YAN M, et al. Advanced research on the pharmacology of chlorophyll and its derivatives [J]. Cent South Pharm(中南药学), 2006, 4(2): 146-148.
- [4] KAMAT J P, BOLOOR K K, DEVASAGAYAM T P. Chlorophyllin as an effective antioxidant against membrane damage *in vitro* and *ex vivo* [J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1487(2/3): 113-127.
- [5] Boloor K K, Kamat J P, Devasagayam T P. Chlorophyllin as a protector of mitochondrial membranes against gamma-radiation and photosensitization [J]. Toxicology, 2000, 155(1-3): 63-71.
- [6] XU X Q. Research on pigment extracted from the byproduct of silkworm and applied to dye silk fabrics [D]. Soochow: Soochow University, 2007.
- [7] SUN B, LI Y, WU H L, et al. Progress in study of extracting process of silkworm excrement [J]. China Sericulture(中国蚕业), 2009, 31(4): 18-21.
- [8] ARNON D L. Copper enzymes in isolated chloroplasts, polyphenol oxidase in Beta vulgaris [J]. Plant Physiol, 1949, 24(1): 1-15.
- [9] WANG ZH Y, ZHOU Y. Study on the preparation technic of pheophorbide from silkworm excrement [J]. J China Pharm(中国药房), 2001, 12(3): 148-149.
- [10] ZHANG J H, SHENG M G, CHU D B. Analysis on exploitation and multipurpose use of silkworm excrement resource [J]. Resource Develop Market(资源开发与市场), 2007, 23(10): 924-926.
- [11] PANG H. Effects of different solvent on extraction of chlorophyll from silkworm excrement [J]. J Hangzhou Teachers Coll(Nat Sci Ed)(杭州师范学院学报:自然科学版), 2006, 5(1): 50-52.
- [12] WANG K, HAI H, JIN W Y, et al. Study on microwave-assisted extraction of chlorophyll from silkworm feces [J]. Food Science(食品科学), 2009, 30(6): 76-79.
- [13] LIU T B, PENG Y F. Extracting chlorophyll from silkworm litter assisted with ultrasonic [J]. Sci Sericulture(蚕业科学), 2007, 33(4): 698-700.

收稿日期: 2011-12-27

暑热宁合剂水提醇沉工艺研究

阎雪梅, 李凤丽, 宋洁瑾(天津中医药大学第一附属医院制剂室, 天津 300193)

摘要: 目的 筛选暑热宁合剂水提醇沉最佳工艺条件。方法 采用高效液相色谱法测定水煎液和醇沉液中葛根素的含量;以葛根素提取率和干膏率为评价指标,采用正交试验法考察加水量、煎煮时间、提取次数等因素对水提工艺的影响;同时考察醇沉浓度对醇沉工艺的影响。结果 最佳水提工艺条件为加入 10 倍水,煎煮 3 次,每次 1.5 h;最佳醇沉工艺条件为加入乙醇使含醇量达 65%。结论 优选的方法可为暑热宁合剂提取醇沉工艺提供实验依据。

基金项目:“重大新药创制”科技重大专项项目(2010ZX09102-201)

作者简介:阎雪梅,女,硕士,副主任药师 Tel: 13512236965 E-mail: ljyxm@126.com