

# 僵蚕中总黄酮提取工艺研究

黄居敏, 张亚梅, 李旻, 张普照\*, 杨明 (江西中医药大学, 江西南昌 330004)

**摘要** [目的]优化僵蚕中总黄酮的提取工艺,测定僵蚕中总黄酮的含量。[方法]以总黄酮含量为评价指标,采用单因素和 Box-Behnken 试验设计,考察乙醇体积分数、提取时间、料液比、提取次数、药材粒径对僵蚕总黄酮提取效果的影响。[结果]僵蚕在体积分数 90% 乙醇溶液、料液比 1:15(g/ml) 的条件下提取 1 h 的总黄酮得率最高,为 1.85%。[结论]优选的总黄酮提取工艺稳定可行,建立的含量测定方法准确可靠。

**关键词** 僵蚕总黄酮;提取工艺;含量测定

中图分类号 R282.74 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2015)34-154-04

## Optimization of Extraction Technology of Total Flavonoids from *Bombyx batryticatus*

HUANG Ju-min, ZHANG Ya-mei, LI Yan, ZHANG Pu-zhao\* et al (Jiangxi University of TCM, Nanchang, Jiangxi 330004)

**Abstract** [Objective] The research aimed to optimize the extraction technology of total flavonoids from *Bombyx batryticatus* and determine the of total flavonoids. [Method] With total flavonoids content as evaluation index, ethanol volume, extracting time, material ratio, extracting times and the material's size were selected to evaluate the effect on the total flavonoids from *Bombyx batryticatus* by single factor test and Box-Behnken design. [Result] The highest yield of total flavonoids was achieved to 1.85%, in which the ethanol volume was 90%, material ratio was 1:15(g/ml) and extracting time was 1h. [Conclusion] The optimum extraction technology of total flavonoids from *Bombyx batryticatus* was stable and feasible. The determination method of total flavonoids was accurate and reliable.

**Key words** Total flavonoids from *Bombyx batryticatus*; Extraction technology; Content determination

僵蚕,又名天虫、姜虫,是 4~5 龄家蚕经白僵菌感染僵化而死的干燥虫体,具有息风止痉、祛风止痛、化痰散结之功<sup>[1]</sup>。蚕以桑为食,桑叶中富含黄酮类物质,故而蚕体内含有大量黄酮类代谢产物。研究表明,蚕体内黄酮类化合物与桑叶中的黄酮类化合物在成分上存在差异,不同蚕品种间及不同发育时期所含黄酮类化合物含量也不同<sup>[2-6]</sup>。此外,蚕经白僵菌侵染后,体内化学成分在白僵菌的作用下也会发生变化。日本学者从僵蚕中分离得到经白僵菌转化后的特有产物,其中 1 个为黄酮类代谢产物<sup>[7]</sup>。到目前为止,已从僵蚕中分离得到多个黄酮类化合物,如槲皮素-7-O-β-D-4-O-甲基葡萄糖苷、山奈酚-7-O-β-D-4-O-甲基葡萄糖苷及槲皮素、山奈酚,其中槲皮素-7-O-β-D-4-O-甲基葡萄糖苷和山奈酚-7-O-β-D-4-O-甲基葡萄糖苷为僵蚕特有的代谢产物<sup>[8]</sup>。笔者在此在单因素试验的基础上,应用响应面对僵蚕总黄酮的提取条件进行优化,通过研究僵蚕中总黄酮提取工艺进一步指导僵蚕体内黄酮类化合物的分离及僵蚕在形成过程中黄酮类化合物的变化规律研究。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料与试剂** 僵蚕购自四川省成都荷花池中药材市场,经江西中医药大学中药资源与民族药研究中心曹岚副教授鉴定为僵蚕(*Bombyx batryticatus*)。芦丁对照品购自中国药品生物制品检定所。所用试剂均为国产分析纯。所用仪器为岛津 UV-2550、电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)、数显恒温水浴锅 HH-6(国华电器有限公司)。

## 1.2 试验方法

**1.2.1 标准溶液的配制。**精密称定干燥至恒重的芦丁对照品 11.55 mg,置 50 ml 容量瓶中,用 60% 乙醇溶解并定容至刻度,摇匀即得浓度为 0.231 mg/ml 的标准溶液。

**1.2.2 样品溶液的制备。**各精密称取僵蚕粉末 4 g 于 100 ml 圆底烧瓶中,采用 90% 的乙醇,按料液比 1:10(g/ml)加热回流提取 1 h,过滤,滤液用相应提取剂定容至 100 ml,即得样品溶液。

**1.2.3 方法学考察。**

**1.2.3.1 线性关系考察。**分别精密吸取 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 ml 置于 10 ml 试管中,各加 5% NaNO<sub>2</sub> 溶液 1 ml,摇匀放置 6 min;再加 10% Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 溶液 1 ml,摇匀静置 6 min;加 4% NaOH 溶液 4 ml,摇匀静置 15 min。以同法配制空白对照,在波长 500 nm 处测定吸光度值,在平行处理的条件下测定 3 次,求平均值,得回归方程  $A = 12.45863C + 0.00817$  ( $R^2 = 0.99901$ ),表明芦丁对照品在 0.023~0.069 mg/ml 范围内线性关系良好。

**1.2.3.2 精密度试验。**精密吸取同一供试品溶液 1 ml,按“1.2.3.1”方法连续测定 6 次,供试品溶液的吸光度平均值为 0.474,  $RSD = 0.4\%$ 。

**1.2.3.3 稳定性试验。**精密吸取供试品溶液 1 份,按“1.2.3.1”方法显色,于 500 nm 处测定吸光度,并每间隔 5 min 测定 1 次吸光度。结果在 25 min 内,吸光度平均值为 0.46,  $RSD = 2.2\%$ ,说明供试品溶液在 25 min 内显色稳定。

**1.2.3.4 重复性试验。**取僵蚕粉碎药材 6 份,按“1.2.2”和“1.2.3.1”项下供试品溶液的制备及显色方法处理样品,于 500 nm 测定吸光度平均值为 0.445,  $RSD = 1.6\%$ ,表明该方法重复性良好。

**1.2.3.5 加样回收率试验。**精密量取已知黄酮含量的僵蚕提取液,分别加入一定量的芦丁对照品溶液,按“1.2.3.1”方

**基金项目** 江西省卫生厅项目(2014A005);江西民族传统药现代科技与产业发展协同创新中心子课题(JXXT201402017);江西省研究生创新基金(YC2014-S276)。

**作者简介** 黄居敏(1989-),女,四川成都人,硕士研究生,研究方向:中药药剂学。\*通讯作者,讲师,博士,从事天然产物化学研究。

**收稿日期** 2015-11-06

法测定,用回归方程计算总黄酮含量,测得平均加样回收率为 100.01% (表 1),  $RSD = 2.81\%$ ,表明该法回收率良好。

表 1 加样回收率试验

已知含量 mg/ml	加入量 mg/ml	测得值 mg/ml	回收率 %
0.352 8	0.185	0.540 9	101.68
0.354 6	0.185	0.546 5	103.73
0.346 9	0.185	0.528 0	97.89
0.338 6	0.185	0.528 8	102.81
0.353 0	0.185	0.532 0	96.76
0.347 4	0.185	0.527 2	97.19

**1.2.4 样品总黄酮含量测定。**精密吸取样品溶液 1 ml 置于 10 ml 试管中,按“1.2.3.1”项下“各加 5%  $\text{NaNO}_2$  溶液 1 ml 至在波长 500 nm 处测定吸光度值”,在平行处理的条件下测定 3 次,根据回归方程计算样品中总黄酮含量。总黄酮含量  $= \frac{C \times V \times V_0}{v \times W \times 1000} \times 100\%$ ,式中,  $C$  为标准曲线上查出的质量浓度 (mg/ml);  $V$  为反应体积 (ml);  $V_0$  为配制的溶液体积 (ml);  $v$  为取样量 (ml);  $W$  为提取物质量 (g)。

**1.2.5 单因素试验。**

**1.2.5.1 乙醇浓度对总黄酮含量的影响。**采用 50%、60%、70%、80%、90% 的乙醇,料液比 1:10 (g/ml),加热回流提取 1 h,平行 3 组,将滤液定容至 100 ml,测定其吸光度,考察不同乙醇浓度对总黄酮提取率的影响。

**1.2.5.2 料液比对总黄酮含量的影响。**采用料液比 1:5、1:10、1:20、1:30 (g/ml),80% 乙醇加热回流提取 1 h,平行 3 组,将滤液定容至 100 ml,测定其吸光度,考察不同料液比对总黄酮提取率的影响。

**1.2.5.3 提取时间对总黄酮含量的影响。**采用料液比 1:10 (g/ml)、80% 乙醇,分别加热回流提取 0.5、1.0、1.5、2.0 h,平行 3 组,将滤液定容至 100 ml,测定其吸光度,考察不同提取时间对总黄酮提取率的影响。

**1.2.5.4 提取次数对总黄酮含量的影响。**采用料液比 1:10 (g/ml)、80% 乙醇,分别加热回流提取 1、2、3 次,每次 1 h,平行 3 组,将滤液定容至 100 ml,测定其吸光度,考察不同提取次数对总黄酮提取率的影响。

**1.2.5.5 粒径对总黄酮含量的影响。**采用料液比 1:10 (g/ml)、80% 乙醇,分别对过 2 号筛、3 号筛、4 号筛、5 号筛、6 号筛的僵蚕粉末加热回流提取 1 次,提取时间 1 h,平行 3 组,滤液定容至 100 ml,测定其吸光度值,考察不同粒径对总黄酮提取率的影响。

**1.2.6 响应面法优化总黄酮最佳提取工艺。**根据单因素试验结果,选取乙醇浓度、料液比、提取时间 3 个因素为主要考察因素,应用 Design-Expert 8.0 软件,设计 3 因素 3 水平的响应面试验 (表 2),利用响应面试验结果,即取僵蚕粉末 4 g,精密称定,按 Box-Behnken Design 设计表中的条件进行提取,过滤后定容至 100 ml 容量瓶中,按“1.2.3.1”方法显色后测定吸光度,确定僵蚕中总黄酮的最佳提取条件。

表 2 响应面试验因素与水平表

水平	因素		
	A(乙醇浓度//%)	B(提取时间//h)	C(料液比)
-1	70	0.5	1:5
0	80	1.0	1:10
1	90	1.5	1:15

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素试验结果

**2.1.1 乙醇浓度对僵蚕总黄酮含量的影响。**由图 1 可见,总黄酮含量随乙醇浓度的升高先增加后降低,当乙醇浓度为 80% 时,总黄酮含量最高,故选 80% 乙醇为最佳提取溶剂。

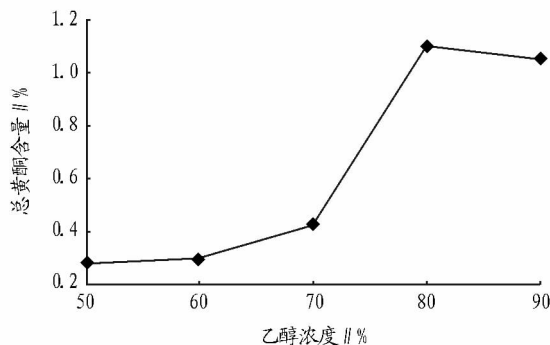


图 1 乙醇浓度对僵蚕总黄酮含量的影响

**2.1.2 料液比对僵蚕总黄酮含量的影响。**从图 2 可以看出,当料液比为 1:10 (g/ml) 时总黄酮含量最高,故选 1:10 作为总黄酮提取的料液比。

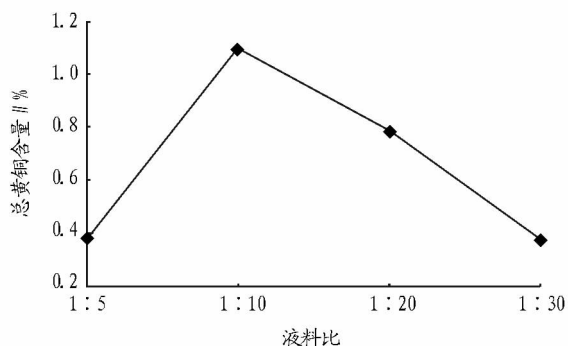


图 2 料液比对僵蚕总黄酮含量的影响

**2.1.3 提取时间对僵蚕总黄酮含量的影响。**由图 3 可见,在 1 h 时总黄酮含量最高,故选 1 h 作为提取时间。

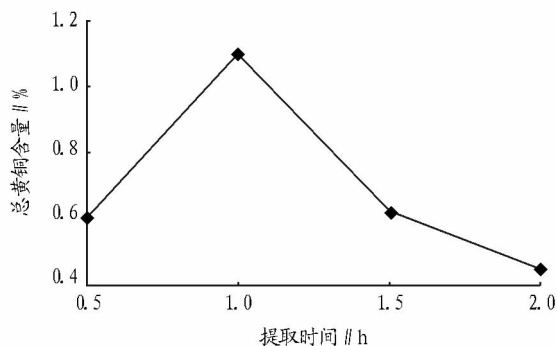


图 3 提取时间对僵蚕总黄酮含量的影响

**2.1.4 提取次数对僵蚕总黄酮含量的影响。**图4显示,随着提取次数的增加,总黄酮含量变化不大,考虑到时间和经济成本,提取1次。

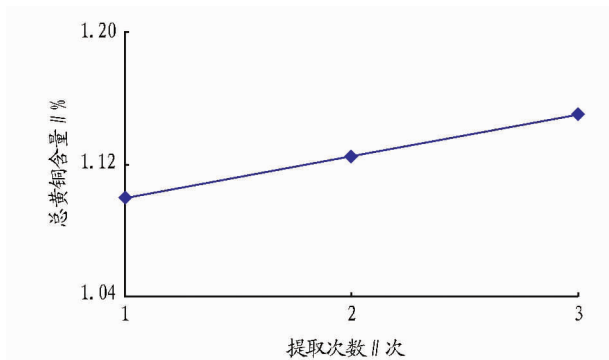


图4 提取次数对僵蚕总黄酮含量的影响

**2.1.5 粒径对僵蚕总黄酮含量的影响。**从图5可看出,随着粒径的减小,总黄酮含量增加,但3~6号筛增幅不大,故综合考虑选取过3号筛但不过7号筛的僵蚕粉末作为研究对象。

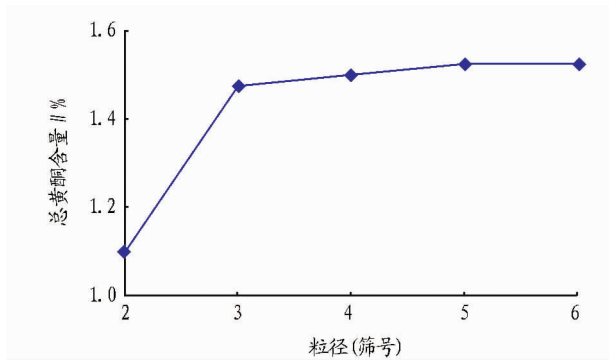


图5 粒径对总黄酮含量的影响

**2.2 响应面法优化总黄酮最佳提取工艺试验结果** 通过Design-Expert 8.0软件对响应面法试验优化僵蚕总黄酮提取工艺的结果(表3)进行分析,发现回归模型极其显著( $P < 0.0001$ ),说明建立的模型有意义;失拟项  $P = 0.7396 > 0.05$ ,无显著性差异,说明模型拟合度良好( $R^2 = 0.9720$ ),表明可用此模型和方程来分析和预测僵蚕总黄酮的提取率。以僵蚕中总黄酮得率为响应值,经回归拟合后,得到回归方

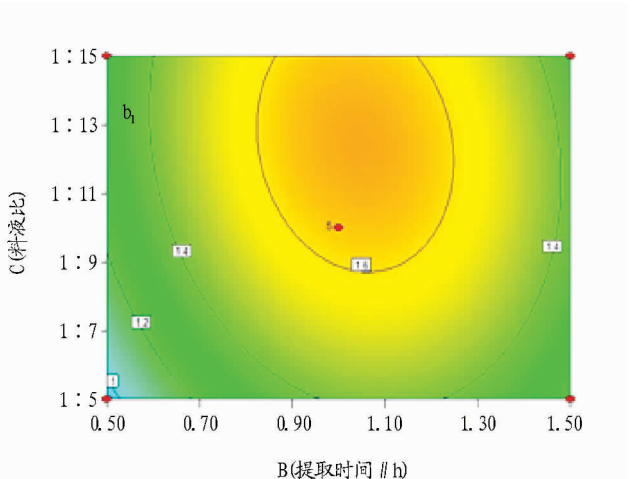
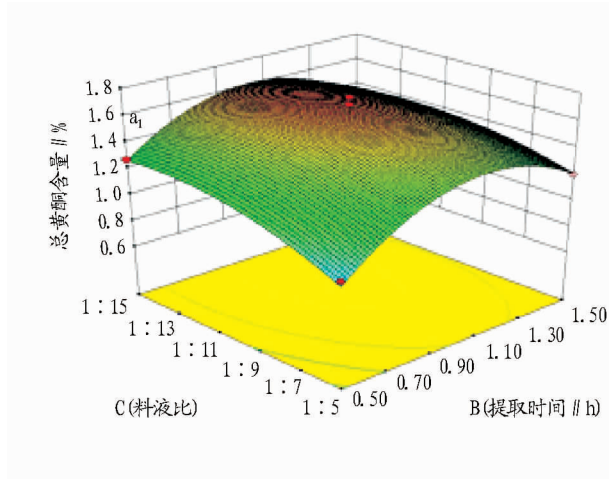
程:总黄酮得率 =  $1.63 + 0.28A + 0.072B + 0.10C - 0.031AB + 0.056AC - 0.050BC - 0.20A^2 - 0.33B^2 - 0.11C^2$ 。经检验,回归模型的校正决定系数  $R_{adj}^2$  为0.9359,说明此模型能解释93.59%响应值的变化,即此模型与数据拟合度较好。回归模型系数显著性检验结果显示,模型的一次项中A(乙醇浓度)、B(提取时间)、C(料液比)均显著,其中A影响程度最为显著;二次项  $B^2$  影响为极显著,  $A^2$ 、 $C^2$  显著。由此可知,各影响因素间不是简单的线性关系。在选取的各因素水平范围内,按照对结果的影响排序为乙醇浓度 > 料液比 > 提取时间。

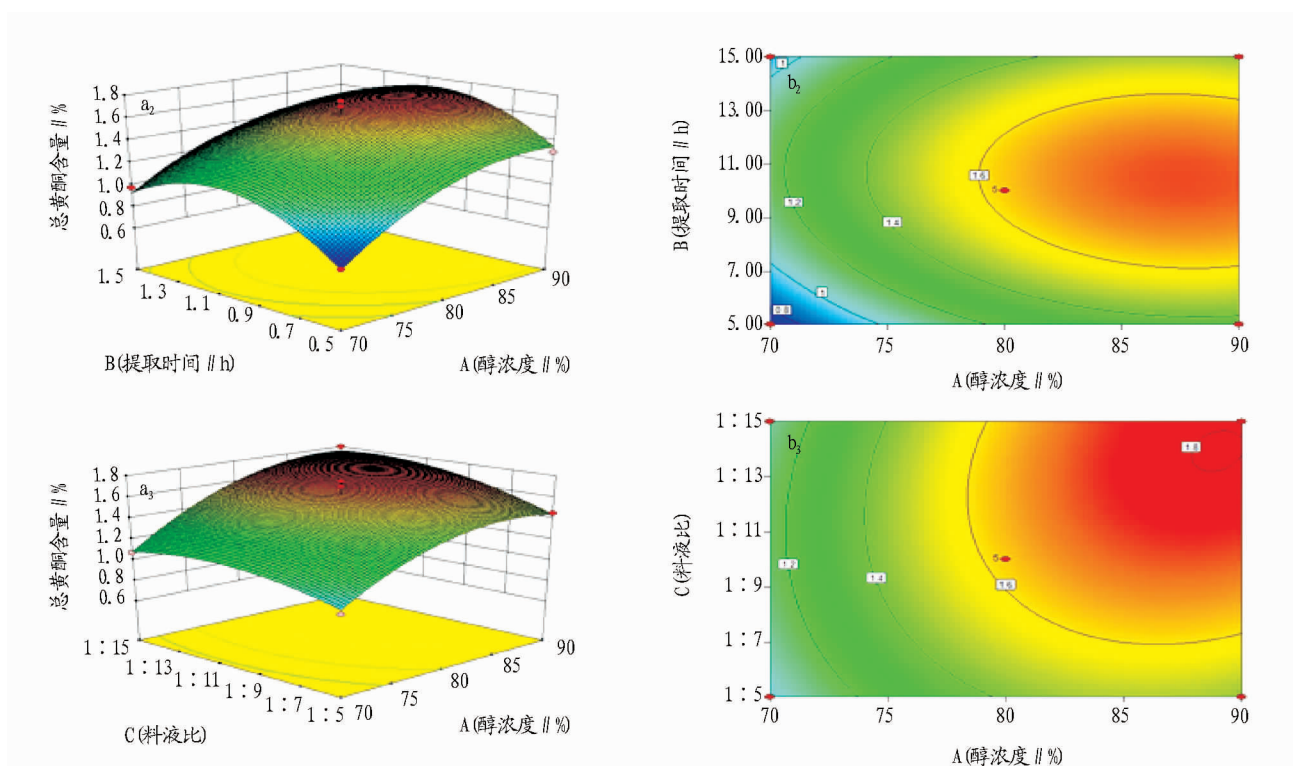
表3 响应面试验设计及结果

试验号	A(乙醇浓度 // %)	B(提取时间 // h)	C(料液比)	总黄酮含量 // %
1	80	0.5	1:15	1.275
2	70	1.0	1:5	0.950
3	80	1.5	1:5	1.200
4	80	1.5	1:15	1.275
5	90	1.0	1:5	1.450
6	80	1.0	1:10	1.550
7	70	1.0	1:15	1.075
8	90	1.0	1:15	1.800
9	70	1.5	1:10	0.975
10	80	1.0	1:10	1.550
11	80	0.5	1:5	1.000
12	70	0.5	1:10	0.725
13	90	0.5	1:10	1.300
14	90	1.5	1:10	1.425
15	80	1.0	1:10	1.600
16	80	1.0	1:10	1.750
17	80	1.0	1:10	1.700

**2.3 各因素间的交互作用** 从响应面分析图可形象地看出最佳参数及各参数间的相互作用,若曲线越陡,表明该因素对总黄酮得率的影响越大,相应表现为响应值变化的大小;而由等高线可以看出为椭圆形表明两因素间交互作用较显著。从图6可以看出,乙醇浓度对总黄酮得率影响最大,料液比次之,与方差分析结果相吻合。

**2.4 验证试验** 通过软件分析确定僵蚕总黄酮的最佳提取工艺为乙醇浓度90%、料液比1:15、提取时间1h,此条件下计算出的总黄酮得率理论值为1.76%。依据确定的最佳提取工艺进行验证试验( $n = 5$ ),得总黄酮平均得率为1.85%,  $RSD = 2.13%$ ,测定结果稳定,证明该结果合理可靠。





注:  $a_1$ 、 $b_1$  为料液比与提取时间;  $a_2$ 、 $b_2$  为乙醇浓度与提取时间;  $a_3$ 、 $b_3$  为乙醇浓度与料液比。

图6 各因素间的交互作用

### 3 结论与讨论

该试验在单因素试验的基础上,应用响应面分析法优化僵蚕总黄酮的提取工艺得出:僵蚕在体积分数 90% 乙醇溶液、料液比 1:15 (g/ml) 的条件下提取 1 h 的总黄酮得率最高,为 1.85%,与模型预测值相符。表明该法优选的总黄酮提取工艺稳定可行,建立的含量测定方法准确可靠。

僵蚕作为临床上常用的虫类药材,其总黄酮的药理活性及物质基础研究较为薄弱,该试验通过对总黄酮提取工艺的研究,对后续僵蚕中黄酮类化合物的分离制备及药理学研究具有一定的指导作用。

### 参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 二部[S]. 北京: 化学工业出版社

(上接第 149 页)

### 3 结论与讨论

通过上述试验得出筛选模型最佳检测波长 713 nm、饱和  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液的用量 3.0 ml、Folin-Denis 试剂用量 5.0 ml、显色时间 70 min,适用于 50 ml 反应体系。除麒麟菜外,笔者还研究该方法在江蓠、紫菜、石花菜等红藻中的适用性,回收率均在 80% ~ 120%,说明此方法可用于筛选高酚类化合物含量的红藻。此筛选方法脱离了酶和底物的限制,准确、简单、快速且成本低,可以与总溴化合物含量的方法相结合作为高溴酚含量的热带海洋红藻的初步筛选方法,为后期提取和发现新溴酚化合物及研究其降血糖活性打下了基础,为红藻的充分利用提供了广阔的天地,促进了人类对海洋药物的进一步开发和利用。

- 社,2010.
- [2] 金洁,刘淑梅,时连根. 家蚕幼虫体中黄酮类化合物含量的变化规律[J]. 蚕业科学,2005,31(2):141.
- [3] 刘利,潘一乐. 不同桑种桑叶总黄酮含量分析[J]. 中国农学通报,2008,24(1):488.
- [4] 潘云海,薛忠民,苏超. 家蚕幼虫体中黄酮类化合物的提取与测定[J]. 北方蚕业,2009,30(4):29.
- [5] 肖阳,吴福泉,王振江,等. 蚕体黄酮类化合物的提取及不同家蚕品种间的含量差异[J]. 蚕业科学,2011,37(2):358.
- [6] 藏楠,王学英,孙佳,等. 不同品种不同发育时期的柞蚕幼虫黄酮类化合物的提取及含量变化[J]. 食品研究与开发,2008,29(5):35.
- [7] KIKUCHI H, TAKAHASHI N, OSHIMA Y. Novel aromatics bearing 4-O-methylglucose unit isolated from the oriental crude drug *Bombyx Baryticatus*[J]. Tetrahedron lett,2004,45(2):367.
- [8] 蒋学. 白僵蚕活性成分分离纯化及其药理作用的研究[D]. 杭州:浙江大学,2013:22-34.

### 参考文献

- [1] 张宏利,朱钺达,骆天红,等. 蛋白酪氨酸磷酸酶 1B 基因多态性与 2 型糖尿病和肥胖的相关性研究[J]. 中华内分泌代谢杂志,2006,22(1):45-48.
- [2] 孙雪,徐年军,郭俊明,等. 2 种海藻溴酚类化合物的抗肿瘤作用及其机制研究[J]. 中国中药杂志,2010,35(9):1173-1176.
- [3] ZHAO J, FAN X, WANG S, et al. Bromophenol derivatives from the red alga *Rhodomela confervoides*[J]. Journal of natural products,2004,67(6):1032-1035.
- [4] FAN X, XU N J, SHI J G. A new brominated phenylpropylaldehyde and its dimethyl acetal from red alga *Rhodomela confervoides*[J]. Chin Chem Lett,2003,14(10):1045-1047.
- [5] 史大永,韩丽君,范晓,等. 两种溴酚类在制备治疗恶性肿瘤药物中的应用:中国, CN101342158[P]. 2009.
- [6] 史大永,范晓,韩丽君,等. 溴酚类化合物在制备治疗恶性肿瘤药物中的应用:中国, CN101283998[P]. 2008.