

发酵蜈蚣粉中总黄酮类含量测定的方法学研究

刘春雨¹, 王集会^{2*}

(1. 山东中医药大学药学院, 山东济南 250355; 2. 山东中医药大学实验中心, 山东济南 250355)

摘要 [目的] 建立紫外可见分光光度法测定发酵蜈蚣粉中总黄酮类化合物含量的方法。[方法] 通过醇水提取发酵蜈蚣粉中总黄酮类化合物, 在 510 nm 下测定其吸光度并计算其含量。[结果] 黄酮类化合物浓度在 0.02 ~ 0.10 mg/mL 时, 其浓度与对应的吸光度呈良好的线性关系; 在精密度试验中, 发酵蜈蚣粉中总黄酮类化合物的平均吸光度为 0.420 5, $RSD = 0.740\%$; 在重现性试验中, 发酵蜈蚣粉中总黄酮类化合物的平均质量比为 9.091 mg/g, $RSD = 2.007\%$; 在加样回收率试验中, 其平均回收率为 97.92%, $RSD = 1.568\%$ 。[结论] 采用紫外可见分光光度法对发酵蜈蚣粉中总黄酮类化合物含量进行测定, 其精密度、重现性、回收率均良好, 可用来测定发酵蜈蚣粉中总黄酮类化合物的含量。

关键词 发酵蜈蚣粉; 总黄酮; 紫外可见分光光度法; 方法学

中图分类号 S865.4⁹ 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2016)17-154-02

The Methodology for Determination of Total Flavonoids Content in Fermented Centipede Powder

LIU Chun-yu¹, WANG Ji-hui^{2*} (1. School of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan, Shandong 250355; 2. Experimental Centre, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan, Shandong 250355)

Abstract [Objective] To establish a method that using UV-VIS spectrophotometry to determine total flavonoids content in fermented centipede powder. [Method] Through the aqueous alcohol extracting from fermented centipede powder, the absorbances at 510 nm of total flavonoids were determined and contents were calculated. [Result] Concentration of flavonoids, within the scope of 0.02 to 0.10 mg/ml, its concentration and the corresponding absorbance showed good linear relationship; in the precision test of determination of total flavonoids in fermentation centipede powder, the average absorbance was 0.420 5, $RSD = 0.740\%$; in the reproducibility experiment, the average quality was 9.091 mg/g, $RSD = 2.007\%$. In the sample recovery rate test of determination, its average recovery was 97.92%, $RSD = 1.568\%$. [Conclusion] By UV-VIS spectrophotometry for determination of total flavonoids content in fermented centipede powder, its precision, repeatability and recovery rate are good. So the method can be used to determine the flavonoids in fermented centipede powder.

Key words Fermented centipede powder; Total flavonoids; UV-VIS spectrophotometry; Methodology

蜈蚣为蜈蚣科动物少棘巨蜈蚣 (*Scolopendra subspinipes mutilans* L. Koch) 的干燥体, 其辛味, 性温, 有毒^[1]。蜈蚣作为传统中药材, 具有息风止痉、解毒散结、通络止痛的作用^[2], 临床常用于治疗肿瘤、原发性高血压、糖尿病及并发症、神经性头痛、偏头痛等^[3-4]。而黄酮类化合物具有抗炎、抗氧化压力和促进抑癌基因表达的作用^[5], 因而成为人们研究的热点。通过使用球孢白僵菌 (*Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill) 对蜈蚣进行发酵可以提高蜈蚣中黄酮类物质的含量, 增强其解毒散结的功效, 还可以较大幅度地改变药性、提高疗效、降低毒副作用^[6]。笔者通过紫外可见分光光度法对发酵蜈蚣粉总黄酮类化合物含量进行测定, 并对其方法学进行考察, 旨在为今后发酵蜈蚣粉中总黄酮类化合物药理活性研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 仪器。 UV9100B 型紫外可见分光光度计 (北京莱伯泰科仪器有限公司), KQ-500E 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司), ST 16R 高速冷冻离心机 (赛默飞世尔科技(中国)有限公司), SHB-III 循环水式多用真空泵 (郑州长城科工贸有限公司), FA1004N 电子天平 (上海精密科学仪器有限公司), SK-1 快速混匀漩涡器 (中国深圳), 远红外辐射干燥箱 (上海阳光实验仪器有限公司), 梅特勒—托利多分

析天平 (上海先悦机电有限公司)。

1.1.2 试剂。 芦丁对照品 (中国医药上海化学试剂公司); 乙醇、亚硝酸钠、六水氯化铝、氢氧化钠等试剂均为分析纯。

1.1.3 供试品。 蜈蚣粉购自安徽亳州市 (批号: 20150730), 经山东中医药大学药学院高德民副教授鉴定为少棘巨蜈蚣粉 (*Scolopendra subspinipes mutilans* L. Koch)。发酵蜈蚣粉 (批号: 20150801) 由山东中医药大学化学实验室自制。

1.2 试验方法

1.2.1 芦丁标准品溶液的制备。 精密称取芦丁对照品 20 mg, 用 60% 乙醇溶解后, 移入 100 mL 容量瓶定容至刻度线, 摇匀, 即得浓度为 0.2 mg/mL 的标准溶液, 置于 4 °C 冰箱保存备用。

1.2.2 发酵蜈蚣粉的制备。 称取适量灭菌后的少棘巨蜈蚣粉, 加入活的白僵菌 (*Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill) 孢子粉混悬液 (100 亿/g, 山东农业科学院植物保护研究所自筛菌株——桃 5), 再加入适量吐温-80 助溶, 用适量灭菌水将其稀释为含 1×10^8 个孢子的混悬液, 拌匀湿润, 在温度 25 ~ 28 °C、湿度 95% 的条件下, 在恒温恒湿培养箱中发酵 8 d 左右, 待长满菌丝后停止发酵。

1.2.3 蜈蚣粉醇提液的制备。 精密称取发酵蜈蚣粉 1 g (料液比为 1:30), 加入 30 mL 80% 乙醇, 超声 20 min, 于 100 °C 下回流 2.5 h, 进行抽滤, 取上清液于 8 000 r/min 离心 20 min, 收集上清液于 50 mL 容量瓶中定容, 置于 4 °C 冰箱保存备用。

1.2.4 紫外可见分光光度法测定发酵蜈蚣粉中总黄酮类化合物。

基金项目 山东中医药大学大学生研究训练 (SRT) 计划资助项目 (2015308)。

作者简介 刘春雨 (1995 -), 女, 山东济南人, 本科生, 专业: 制药工程。
* 通讯作者, 副教授, 从事虫类中药发酵及活性成分研究。

收稿日期 2016-05-10

1.2.4.1 标准曲线的绘制。分别精密量取“1.2.1”的标准液0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL于10 mL试管中,先加30%乙醇至5 mL,再加5%亚硝酸钠溶液0.3 mL;摇匀后静置6 min;然后加10%六水氯化铝0.6 mL,摇匀后静置5 min;最后加入1 mol/L氢氧化钠溶液2 mL,并用30%乙醇稀释至刻度,摇匀后于510 nm处测定其吸光度。以芦丁标准品质量为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线。

1.2.4.2 精密性试验。精密称取发酵蜈蚣粉2 g,按“1.2.3”的方法提取试样液并吸取此试样液,重复取样5次,每次2 mL,分别用紫外可见分光光度法在波长510 nm下测定其总黄酮类化合物的吸光度,方法同“1.2.4.1”,并计算相对标准误差RSD。

1.2.4.3 重现性试验。精密称取发酵蜈蚣粉2 g,共5份,按“1.2.3”的方法提取试样液并吸取此试样液,在波长510 nm下测定其总黄酮类化合物的吸光度,方法同“1.2.4.1”,并根据标准曲线计算其总黄酮类化合物含量及相对标准误差RSD。

1.2.4.4 加样回收率试验。精密称取总黄酮类化合物含量为9.090 6 mg/g的发酵蜈蚣粉约2 g,共5份,分别加入芦丁标准品,按“1.2.3”的方法提取试样液并吸取此试样液,在波长510 nm下测定其加样后总黄酮类化合物的吸光度,方法同“1.2.4.1”,计算总黄酮类化合物的含量,加样回收率及相对标准误差RSD。

2 结果与分析

2.1 标准曲线 标准曲线方程为 $Y = 1.134 9x + 0.007$,相关系数 $r = 0.999 8$ 。表明芦丁浓度在0.02~0.10 mg/mL时,其浓度与对应的吸光度呈良好的线性关系,符合 Lambert-Beer 定律,可用此计算发酵蜈蚣粉中总黄酮类化合物的含量。

2.2 精密性 由表1可知,平均吸光度为0.420 5,相对标准误差 $RSD = 0.740 7\%$,符合 $RSD \leq 5\%$ 的要求,说明该方法精密性良好。

表1 精密性

Table 1 Precision test results

编号 No.	吸光度 Absorbance	平均吸光度 Average absorbance	RSD %
1	0.416 3	0.420 5	0.740 7
2	0.418 6		
3	0.422 2		
4	0.419 9		
5	0.425 4		

2.3 重现性 由表2可知,平均质量比为9.091 mg/g,相对标准误差 $RSD = 2.007\%$,符合 $RSD \leq 5\%$ 的要求,说明该方法重现性良好。

表2 重现性

Table 2 Reproducibility test results

编号 No.	供试品质量 Quality of tested samples // g	吸光度 Absorbance	质量比 Mass ratio mg/g	平均质量比 Average mass ratio // mg/g	RSD %
1	2.000 5	0.420 5	9.108 3	9.091	2.007
2	2.000 0	0.418 5	9.064 4		
3	2.000 7	0.407 5	8.823 1		
4	2.000 9	0.433 5	9.395 6		
5	2.000 7	0.418 4	9.061 5		

2.4 加样回收率 由表3可知,平均回收率为98.92%,符合回收率在95%~105%的要求,相对标准误差 $RSD = 1.568\%$,符合 $RSD \leq 5\%$ 的要求,说明回收率较高。因此,该方法可用来测定发酵蜈蚣粉中黄酮类化合物的含量。

表3 加样回收率

Table 3 Test results of sample recovery rate

编号 No.	样品中量 Amount in sample mg	加入量 Addition amount mg	吸光度 Absorbance	测出量 Measured quantity mg	回收率 Recovery rate // %	平均回收率 Average recovery rate // %	RSD %
1	18.216 6	5	0.526 0	22.864 5	98.48	97.92	1.568
2	18.128 9	5	0.510 3	22.173 8	95.87		
3	17.646 2	5	0.513 5	22.313 8	98.53		
4	18.791 2	5	0.547 9	23.828 3	100.16		
5	18.123 0	5	0.513 7	22.325 0	96.55		

3 结论与讨论

该试验采取的紫外可见分光光度法具有设备简单、适用性广、准确度和精密性较高的特点,在中药总黄酮含量分析中发挥重要作用^[7]。因此,该试验对发酵蜈蚣粉中总黄酮类化合物采用紫外可见分光光度法进行研究,结果表明,该方法精密性、重现性及回收率均在要求范围之内,可作为测定发酵蜈蚣粉中总黄酮类化合物的有效方法,旨在为今后发酵蜈蚣粉中总黄酮类化合物药理活性研究提供理论依据。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部(2010年)[S]. 北京:中国

医药科技出版社,2010:335-336.

- [2] 王贤纯. 蜈蚣的药用研究进展[J]. 动物学杂志,2002,37(3):88-91.
 [3] 张艳,刘西建. 抗肿瘤有毒中药现代研究进展[J]. 中国中医药现代远程教育,2012(24):154-158.
 [4] 张敬,洪月光,瞿鑫宏. 久香岩痛宁镇痛作用的实验研究[J]. 河北中医药学报,2001,16(2):33-34.
 [5] 黄华艺,查锡良. 黄酮类化合物抗肿瘤作用研究进展[J]. 中国新药与临床杂志,2002,21(7):428-433.
 [6] 王延年,董雪,乔延江,等. 中药发酵研究进展[J]. 世界科学技术(中医药现代化),2010,12(3):437-440.
 [7] 马陶陶,张群林,李俊. 中药总黄酮的含量测定方法[J]. 安徽医药,2007,11(11):1030-1032.