

# 发酵土鳖虫总黄酮含量的测定及方法学考察

王立娜<sup>1</sup>, 马明珠<sup>1</sup>, 王集会<sup>2\*</sup> (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]研究发酵土鳖虫含水醇提取物中总黄酮含量的测定方法, 并对其方法学进行考察。[方法]采用  $\text{NaNO}_2 - \text{AlCl}_3 - \text{NaOH}$  比色法在 510 nm 处测定黄酮类化合物与显色剂所形成的络合物吸光度。[结果]所测定标准曲线线性相关性良好,  $r = 0.999 0$ , 线性范围在 0.02 ~ 0.10 mg/mL, 试验方法的精密密度  $RSD = 1.92\%$ , 重现性  $RSD = 1.23\%$ , 样品回收率  $95.00\% \pm 10.00\%$ ,  $RSD = 2.09\%$ 。样品重复测定总黄酮含量平均值为 4.630 8 mg/g。[结论]方法学考察结果表明, 用紫外分光光度法测定发酵土鳖虫总黄酮类化合物含量的标准曲线和线性范围、精密密度、准确度和重复性等项内容都符合相关规定, 该方法准确可靠, 可用于含量测定。

**关键词** 发酵土鳖虫; 黄酮络合物; 方法学考察

中图分类号 R282.74 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2016)21-095-03

## Determination and Methodological Investigation on the Total Flavonoids Content in Fermented *Eupolyphaga sinensis* Walker

WANG Li-na<sup>1</sup>, MA Ming-zhu<sup>1</sup>, WANG Ji-hui<sup>2\*</sup> (1. College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan, Shandong 250355; 2. The Experiment Center, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan, Shandong 250355)

**Abstract** [Objective] To detect the total flavonoids content in ethanol extracts from fermented *Eupolyphaga sinensis* Walker, and to investigate the methodology. [Method]  $\text{NaNO}_2 - \text{AlCl}_3 - \text{NaOH}$  colorimetry was used to detect the complex absorbance formed by flavonoids compounds and color developing agent. [Result] The detected standard curve had good linear correlation,  $r = 0.999 0$ . The linear range was between 0.02 and 0.10 mg/mL. The precision of the test was  $RSD = 1.92\%$ ; repeatability was  $RSD = 1.23\%$ ; sample recovery rate was  $95.00\% \pm 10.00\%$ ,  $RSD = 2.09\%$ . The average content of total flavonoids was 4.630 8 mg/g. [Conclusion] Results of methodological investigation showed that the standard curve, linear range, precision, accuracy and repeatability of total flavonoids content in fermented *E. sinensis* all meet the requirements of relevant provisions, which are detected by ultraviolet spectrophotometry. This method is accurate, reliable and can be used for content detection of total flavonoids.

**Key words** Fermented *Eupolyphaga sinensis* Walker; Flavonoids complex compound; Methodological investigation

土鳖又名土元、地鳖, 是鳖蠊科昆虫中华真地鳖 (*Eupolyphagasinensis* Walker) 和冀地鳖 (*Polyphagaplancyi* Bolivar) 的雌体。味咸, 性寒, 有小毒, 能入肝、心、脾三经, 其药用最早记载于秦汉时代的《神农本草经》, 是我国传统的中药材, 具有活血散瘀, 消肿止痛等功效<sup>[1]</sup>。现代药理试验研究充分表明了土鳖虫能够抗肿瘤、抗凝血、溶解血栓以及抑制血小板聚集等功效<sup>[1]</sup>。

白僵菌 [*Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill] 是一种丝状真菌, 属于半知菌亚门, 在其生长过程中可产生多种次生代谢物质, 包括蛋白质、多糖、白僵菌素、黄酮等, 具有一定抗肿瘤活性。白僵菌孢子接触昆虫后, 在适宜的温度条件下萌发, 生长菌丝侵入虫体内进行发酵, 而虫类发酵可以利用微生物在生长过程中产生的强大酶系如蛋白酶糖化酶等将虫类中药中所含有的蛋白、多糖、黄酮等成分转化修饰成活性更强的物质, 从而发挥更大的药效, 增加有效成分利用率。有学者从中华真地鳖石油醚部分得到 1 种黄酮类化合物<sup>[2]</sup>, 而白僵菌在发酵过程中也会产生较多黄酮, 土鳖虫中所含的黄酮类化合物与白僵菌的生长、代谢存在相互作用, 进而改变其含量。目前国内外对发酵土鳖虫黄酮类化合物的研究未见资料报道。因此该试验以球孢白僵菌为发酵菌, 将其接种在土鳖虫粉上, 采用新型固体双向发酵模式对土鳖虫进行深层加工, 建立了球孢白僵菌与土鳖虫二者相互作用后所转化的

黄酮类化合物含量测定的紫外分光光度法, 并进行了方法学考察, 以期从发酵土鳖虫粉中提取黄酮类化合物并加以利用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 药材与试剂。**发酵土鳖虫粉 (山东中医药大学实验室自制, 批号 20150501), 经山东中医药大学高德民老师鉴定为鳖蠊科昆虫地鳖 (*Eupolyphagasinensis* Walker); 白僵菌 [*Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill] 孢子粉 (100 亿/g, 山东省农业科学院植物保护研究所自筛选菌株——桃 5); 芦丁标准品 (CHENGDU MUST BIO-TECHNOLOGY CO, LTD. 含量  $\geq 98.00\%$ , UV)、氢氧化钠、亚硝酸钠、六水氯化铝、乙醇皆为分析纯。

**1.1.2 仪器。**UV9100B 型可见分光光度计 (北京莱伯泰科仪器有限公司); TDZ5-WS 台式多管低速离心机 (长沙非凡仪器仪表有限公司); FA1004N 型电子分析天平 (上海精密仪器有限公司); HH-6 数显恒温水浴锅 (上海梅香仪器有限公司); KQ-500E 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 发酵土鳖虫粉的制备。**精密称取一定量的土鳖虫干粉, 取 1.000 0 g 白僵菌孢子粉, 加少量吐温-80, 用适量灭菌水将其稀释成为每毫升含  $1 \times 10^8$  个孢子的混悬液, 取适量, 拌匀润湿, 25 ~ 28 °C, 湿度为 95%, 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。

**1.2.2 含量测定及方法学考察**<sup>[3]</sup>。

**1.2.2.1 芦丁标准品溶液的配制。**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

**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 (2015325)。

**作者简介** 王立娜 (1996-), 女, 山东临沂人, 本科, 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** 2016-05-30

度,摇匀,即浓度为0.20 mg/mL的标准溶液,置于4℃冰箱保存备用。

**1.2.2.2 标准曲线的绘制。**分别量取标准液0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL于10 mL试管中,补加30%乙醇至5 mL,再加5%的亚硝酸钠溶液300 μL,摇匀后静置6 min;然后加10%的六水氯化铝600 μL,摇匀后静置5 min,最后加入1.0 M的氢氧化钠溶液,并用30%乙醇稀释至刻度。然后在波长510 nm处测定吸光度,以芦丁浓度(Y)对吸光度(X)进行回归分析,制作标准曲线。

**1.2.2.3 含量测定。**精确称取发酵土鳖虫粉2.000 0 g,加入60 mL 80%浓度的乙醇溶液,先超声波震荡处理20 min,于100℃的温度下回流2.5 h。将黄酮粗提液抽滤,弃去残渣,收集滤液。然后将滤液于4℃下8 000 r/min离心20 min,收集上清液入50 mL容量瓶,用30%浓度的乙醇定容至刻度。精确吸取2 mL,按照前文所述方法,自“加30%乙醇至5 mL”起,依次测定吸光度,通过回归方程求得待测样品溶液中黄酮的浓度(C)。

**1.2.2.4 样品的精密度考察。**准确称取发酵土鳖虫粉样品2.000 0 g,按“1.2.2.3”项下方法进行提取和制备溶液,精确吸取同一批试样液平行测定5次,每次2 mL,分别用紫外分光光度法测定510 nm下其黄酮类化合物的吸光度( $A_{510}$ )并计算相对标准误差RSD。

**1.2.3.5 重现性考察。**准确称取发酵土鳖虫粉样品5份,每份2.000 0 g,按“1.2.2.3”项下方法进行提取和制备溶液,重复测定5次。

**1.2.2.6 黄酮化合物的回收率测定。**准确称取已测知总黄酮含量的发酵土鳖虫粉样品5份,每份2.000 0 g,各加入5.00 mg的芦丁标准对照品,按“1.2.2.3”项下方法进行提取和制备溶液,并进行测定。

## 2 结果与分析

**2.1 标准曲线的绘制** 由图1可知,建立的回归方程为: $Y=1.123 1x, r=0.999 0$ 。结果表明,芦丁(黄酮类化合物)

浓度在0.02~0.10 mg/mL范围内,其浓度与对应的吸光度呈现良好的线性关系,符合 Lambert-Beer 定律,根据吸光度来计算其含量是可靠的。

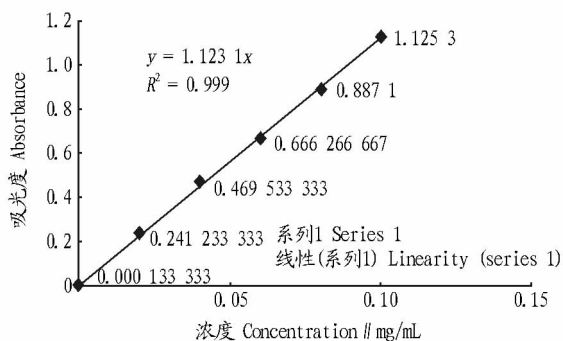


图1 芦丁标准曲线方程

Fig. 1 Equation of rutin standard curve

**2.2 样品的精密度** 连续5次测定吸光值,样品中黄酮含量分别为4.578 1、4.562 5、4.532 1、4.489 1、4.721 3、4.545 3,  $RSD=1.92\%$  ( $n=5$ )。结果表明,样品精密度良好。

**2.3 方法的重现性** 对方法的重现性考察结果(表1),表明,该方法重现良好,  $RSD < 1.50\%$ 。

表1 重现性试验

Table 1 Repeatability test

编号 Code	吸光度 $A_{510}$ Absorbance	质量比 Mass ratio mg/g	平均质量比 Average mass ratio//mg/g	RSD %
1	0.205 7	4.578 8	4.626 0	1.23
2	0.211 1	4.699 0		
3	0.205 6	4.576 6		
4	0.206 7	4.601 1		
5	0.210 0	4.674 6		

**2.4 黄酮化合物的回收率** 表2表明,土鳖虫样品中黄酮化合物的回收率为  $95.00\% \pm 10.00\%$ ,其平均值为  $99.82\%$ ,  $RSD=2.09\%$  ( $n=5$ )。

表2 回收率试验

Table 2 Test of recovery rate

编号 Code	样品中黄酮质量 Flavonoids quality in sample//mg	加标量 Adding amount mg	吸光度 $A_{510}$ Absorbance	测出量 Measured amount mg	回收率 Recovery rate %	平均回收率 Average recovery rate //%	RSD %
1	10.048 1	5.00	0.328 6	14.627 7	97.21	99.82	2.09
2	9.571 7	5.00	0.327 7	14.588 3	100.11		
3	9.286 8	5.00	0.328 4	14.618 8	102.32		
4	9.424 8	5.00	0.327 8	14.594 0	101.17		
5	9.887 8	5.00	0.328 7	14.632 1	98.28		

**2.5 样品总黄酮含量** 试验结果表明,样品重复3次测定的总黄酮含量平均值为4.6308,  $RSD$ 为2.37%。

## 3 讨论

该试验采用  $\text{NaNO}_2 - \text{AlCl}_3 - \text{NaOH}$  显色剂与发酵土鳖虫中的总黄酮发生络合反应,生成吸光物质,然后通过紫外分光光度法测定了发酵土鳖虫中总黄酮类化合物含量,并进行方法学考证。结果表明,该方法可靠、准确,重现性好,稳

定性强,并且操作简便、快速,可用于发酵土鳖虫黄酮类化合物含量的测定,同时也为从发酵土鳖虫粉中提取黄酮类化合物并加以利用提供了理论依据。但是发酵土鳖虫存在的黄酮类化合物往往是混合物而非单一组分,用紫外分光光度法测定的黄酮类化合物含量,有可能是黄酮及其异构体的总量,如多聚酮、异黄酮等。因此将来有必要探索分离度高的测定方法,如高效液相色谱法、薄层扫描法等。

目前关于虫类中药的发酵炮制制药报道并不多见。白僵菌在土鳖虫这个天然固体培养基上的生长、代谢会发生一系列复杂的分解合成反应,产生新的成分和新的功能,使发酵的作用从原来仅具营养作用的培养基变为真菌对培养基的分解、转化、修饰、互相影响的双向型固体发酵模式,从而产生多种次生代谢产物,如蛋白质、多糖、白僵菌素、黄酮等,而且这些生物大分子化合物均具有一定的抗肿瘤、抗病毒等多种药效。尤其在发酵过程中会产生许多黄酮类化合物,这些物质能够通过清除氧自由基抗衰老、抑制癌细胞的生长、诱导肿瘤细胞凋亡、降低心血管疾病以及增强机体免疫力等药理活性<sup>[4]</sup>。因此发酵后的土鳖虫在抗肿瘤、抗病

毒、降低心血管系统疾病的药理活性方面应该会有某些变化,有待于进一步研究。

### 参考文献

- [1] 杨耀芳,杨翎雯,王赛前,等. 土鳖虫口服液镇痛、活血化瘀与红细胞免疫研究[J]. 中成药,2003,25(6):496-498.
- [2] 金向群,严铭铭,黄恩喜,等. 土鳖虫脂溶性成分的研究[J]. 中国中药杂志,1993,18(6):355-356.
- [3] 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
- [4] 张焜. 天然黄酮类化合物的合成研究[D]. 昆明:昆明理工大学,2014.
- [5] HU C Q, CHEN K, SHI Q, et al. Anti-AIDS agents. 10. acacetin-7-O-beta-D-galactopyranoside, an anti-HIV principle from chrysanthemum-morifolium and a structure-activity correlation with some related flavonoids[J]. Journal of natural products, 1994, 57(1):42-51.

(上接第 36 页)

表 1 追肥时期对不同小麦品种群体动态的影响

Table 1 Effects of topdressing stage on population dynamics of different wheat varieties

品种 Varieties	追肥时期 Topdressing period	基本苗 Basic seedling 万/hm <sup>2</sup>	冬前最大分蘖 Maximum tillering before winter//万/hm <sup>2</sup>	春季最大分蘖 Maximum tillering in spring//万/hm <sup>2</sup>	成熟期分蘖 Tillering in mature period //万/hm <sup>2</sup>	成穗率 Ear rate %
济麦 22	返青追肥	225	738.15a	1 702.05a	611.85b	35.95b
Jimai 22	拔节追肥	225	731.25a	1 555.35b	632.55a	40.67a
	开花追肥	225	727.50a	1 544.70b	638.40a	41.33a
临麦 4 号	返青追肥	225	565.80a	1 369.20a	492.60b	35.98b
Linmai 4	拔节追肥	225	575.25a	1 286.10b	514.80a	40.03a
	开花追肥	225	576.45a	1 273.95b	520.95a	40.89a
LN66	返青追肥	225	721.95a	1 865.55a	637.50b	34.17b
	拔节追肥	225	714.75a	1 684.50b	672.00a	39.89a
	开花追肥	225	723.60a	1 663.05b	679.05a	40.83a

注:同列不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

Note: Different lowercases in the same column stand for significant difference ( $P < 0.05$ ).

表 2 追肥时期对不同小麦品种产量及其构成要素的影响

Table 2 Effects of topdressing period on yield and components of different wheat varieties

品种 Varieties	追肥时期 Topdressing stage	穗粒数 Grain number per ear//粒	千粒重 1 000-grain weight//g	成穗数 Ear number 万/hm <sup>2</sup>	产量 Yield kg/hm <sup>2</sup>	成熟期 Mature period 月-日
济麦 22	返青追肥	34.20b	42.36a	611.85b	8 180.70b	06-09
Jimai 22	拔节追肥	35.87a	41.62b	632.55a	8 644.05a	06-09
	开花追肥	36.64a	41.43b	638.40a	8 572.50a	06-10
临麦 4 号	返青追肥	37.95b	43.24a	492.60b	8 059.65b	06-10
Linmai 4	拔节追肥	39.53a	42.15b	514.80a	8 481.90a	06-10
	开花追肥	39.49a	41.74b	520.95a	8 546.25a	06-13
LN66	返青追肥	29.60c	42.51a	637.50b	7 690.80c	06-07
	拔节追肥	31.47b	42.10a	672.00a	8 277.45b	06-08
	开花追肥	33.76a	40.25b	679.05a	8 527.35a	06-09

注:同列不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

Note: Different lowercases in the same column stand for significant difference ( $P < 0.05$ ).

低,此类品种应该采用开花期追肥。

### 3 结论与讨论

该研究结果表明,在试验地地力条件下,返青期追肥由于追肥过早造成小麦早期长势过旺,后期肥料流失大,供肥有些不足,因而穗粒数、成穗数及产量降低。对于大多数品种(如济麦 22 和临麦 4 号),拔节期追肥与开花期追肥相比,在产量及产量构成上均无显著差异,这与周青等<sup>[4]</sup>的研究结果不同;开花期追肥会造成成熟期延迟<sup>[5]</sup>,特别是青秆成熟品种尤为明显,因此拔节期追肥为好。对于后期有早衰迹象的品种 LN66,开花期追肥可以显著提高产量,因而不同品种

适宜的追肥时期是存在差异的。

### 参考文献

- [1] 陈祥,同延安,亢欢虎,等. 氮肥后移对冬小麦产量、氮肥利用率及氮素吸收的影响[J]. 植物营养与肥料学报,2008,14(3):450-455.
- [2] 姜丽娜,郑冬云,王言景,等. 氮肥施用时期及基追比对豫中地区小麦叶片生理及产量的影响[J]. 麦类作物学报,2010,30(1):149-153.
- [3] 沈建辉,戴廷波,荆奇,等. 施氮时期对专用小麦干物质和氮素积累、运转及产量和蛋白质含量的影响[J]. 麦类作物学报,2004,24(1):55-58.
- [4] 周青,陈风华,张国良,等. 施氮时期对弱筋小麦产量和品质的调节效应[J]. 麦类作物学报,2005,25(3):67-70.
- [5] 周奇,赵永敢,张存岭. 氮肥基追比和追肥时期对小麦产量的影响[J]. 安徽农学通报,2009,15(3):92-95.