

绿色木霉固体发酵前后 2 种黄酮类成分含量变化

蒋琪¹,余静贤²,何立美¹,程轩轩¹,彭新宇³,潘育方¹

(1. 广东药科大学中药学院,广东 广州 510006;2. 华南农业大学兽医学院,广东 广州 510642;

3. 广东省农科院动物卫生研究所,广东 广州 510640)

摘要:目的 研究枫蓼药材经绿色木霉发酵后 2 种黄酮成分含量变化。方法 利用高效液相检测法,经绿色木霉发酵 216 h 时枫蓼药材中 2 种黄酮成分的含量,并与发酵前相比较,计算各成分的含量变化。结果 经绿色木霉发酵能增加槲皮素的含量,至发酵时间 72 h 槲皮素含量达到最大值($318 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$),为发酵前的 152%。结论 利用绿色木霉发酵后,可使枫蓼药材中槲皮素含量增加,且发酵时间 72 h 为最佳。

关键词:绿色木霉;枫蓼复方;芦丁;槲皮素

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2017.02.010

Changes of two flavone constituents of Fengliao herb before and after solid fermentation

JIANG Qi¹, YU Jingxian², HE Limei¹, CHENG Xuanxuan¹, PENG Xinyu³, PAN Yufang¹

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou, Guangdong 510006, China; 2. South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China;

3. South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510640, China)

Abstract: Objective To investigate content changes of two flavone constituents of Fengliao herb after fermentation by *Trichoderma viride*. **Methods** HPLC method was adopted to determine the content of two flavone constituents. After 216 h fermentation, content change was evaluated by comparison with before fermentation. **Results** The content of quercetin could be raised after fermenting by *Trichoderma viride*, which reached its maximum after 72 h ($318 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$), 152 % of what before fermentation. **Conclusions** After being fermented by *Trichoderma viride*, the quercetin of Fengliao herb can be raised, and the best fermentation time is 72 h.

Key words: *Trichoderma viride*; Fengliao herb compound; Rutin; Quercetin

枫蓼制剂是海南民间方剂,由牛耳枫和辣蓼两味中药组成,含有的黄酮成分具有除湿化滞、理气健胃的功效。适用于急性胃肠炎所引起的腹痛、腹泻等消化不良症^[1],因此提高枫蓼制剂中黄酮类化合物含量也是提高药效的有效途径之一。芦丁、槲皮素属于黄酮类化合物,具有广泛的生物学作用。近年来,对芦丁、槲皮素的研究日益增多。研究表明芦丁具有抗疲劳、抗氧化、降血糖等作用^[2-4];槲皮素具有清除自由基、抗癌、抗氧化、抗炎等作用^[5-7]。微生物因其有极为丰富的酶系统,所以具有强大的分解及转化物质的能力^[8],通过微生物与中药固体发酵进行中药炮制可以改善中药的功能

活性^[9],降低中药毒副作用^[10],提高中药有效成分之间的转化^[11],产生新的具有药理活性的化合物^[12]。绿色木霉菌是一类在自然界分布广泛的真菌,能产生丰富的具有生物活性的酶系,如几丁质酶、纤维素酶、木聚糖酶等。本研究采用固体发酵方法处理枫蓼药材,探讨了绿色木霉对枫蓼制剂有效成分槲皮素、芦丁 2 种黄酮含量的影响,比较了其发酵前后有效成分含量变化,为枫蓼药材的充分开发与研究提供实验依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器 Waters 高效液相色谱仪(515 HPLC Pump、717 plus Autosampler、996 PDA、2489 UV); Waters Symmetry shield R18 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5.0 μm); UV-3100PC 紫外-可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司); JJ200 电子天平(常熟市双杰测试仪器厂); Molgene 1820a 纯水仪(重庆摩尔实验仪器有限公司); Metter-Toledo-xs 十万分之一天平(瑞士); DL-720A 超声波清洗器(上海之信

基金项目:广东省公益研究与能力建设专项资金项目(2014A020208133);广东省科技计划项目(粤科规划字[2013]137)

通信作者:潘育方,男,教授,硕士生导师,研究方向:物理药剂学与药物制剂设计, E-mail: p34074683@126.com

仪器有限公司); HH-2 数显恒温水浴锅(常州奥华仪器有限公司); LD4-2A 低速离心机(北京医用离心机厂); HWS 智能型恒温恒湿培养箱(宁波江南仪器厂); BHC-1300IIA2 生物安全柜(苏净集团苏州安泰空气技术有限公司); LDZX-50FB 立式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂)。

1.2 材料 提取用的甲酸、甲醇、95% 乙醇均为分析纯级别; 液相用的乙腈为色谱纯级别; 水为屈臣氏蒸馏水; 综合马铃薯培养基(自制)。绿色木霉(GIM3.140)购自广东省微生物菌种保藏中心; 芦丁(批号:100080-200707, 中国食品药品鉴定研究院, 纯度 $\geq 98\%$); 槲皮素(批号: MUST-12072505, 北京恒元启天化工技术研究院, 纯度 $\geq 98\%$); 辣蓼(购于广东茂名)、牛耳枫(购于广东茂名), 经广东药学院李书渊教授鉴定为蓼科植物水辣蓼 *Polygonum hydropiper* Linn. 的全草和虎皮楠科牛耳枫 *Daphniphyllum calycinum* Bench.。

2 方法与结果

2.1 实验方法

2.1.1 培养基的配制 去皮马铃薯 200 g, 切成小块, 加水 1 000 mL 煮沸 20 min, 滤去马铃薯块, 滤液中加葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, KH_2PO_4 8 mg, 硫酸素 8 mg, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g, 溶化后补足水至 1 000 mL, 调培养基 pH = 6。经 121 °C 灭菌 15 min。

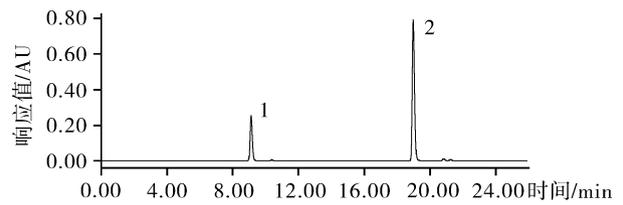
2.1.2 菌种的复苏及扩大培养 用无菌吸管吸取 0.5 mL 适宜的液体培养基, 滴入安瓿瓶内, 轻轻振荡, 使冻干菌种溶解呈悬浮状, 吸取 100 μL 菌体悬浮液, 移植于斜面培养基上, 并于 28 °C 培养。在无菌条件下, 将已活化的菌种接种于综合马铃薯液体培养基中, 在 28 °C, 转速为 115 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的恒温振荡培养箱进行扩大培养 216 h。即得绿色木霉的菌悬液, 备用。

2.1.3 固体发酵 将牛耳枫、辣蓼粉碎, 过 20 目筛, 按牛耳枫:辣蓼(2:1)混合。称取混合均匀的枫蓼粉末 50 g, 分别做 3 份平行实验, 放置 2 h, 121 °C 灭菌 15 min, 加入综合马铃薯培养基 50 mL, 加入浓度为 $10^5 \text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$, 绿色木霉菌悬液 5 mL, 混匀。于温度 28 °C, 湿度 80% 的恒温恒湿培养箱发酵培养 216 h。

2.2 枫蓼芦丁、槲皮素含量测定方法

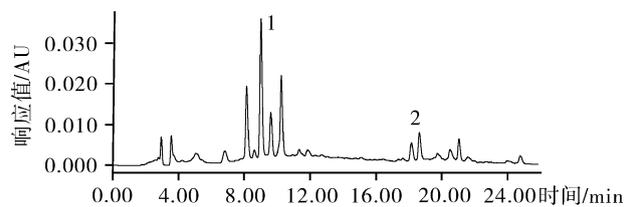
2.2.1 液相色谱条件 色谱柱 Waters Symmetry shield R_{18} 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5.0 μm); 流动相: A 为乙腈, B 为 0.4% 甲酸水溶液; 梯度洗脱: 0 ~ 13 min, A 为 20% ~ 45%; 13 ~ 15 min, A 为 45% ~ 60%; 15 ~ 20 min, A 为 60% ~ 70%; 20 ~ 25

min, A 为 70% ~ 20%。流速: 1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 进样量: 10 μL ; 检测波长: 359 nm; 柱温: 30 °C, 色谱图见图 1 ~ 3。



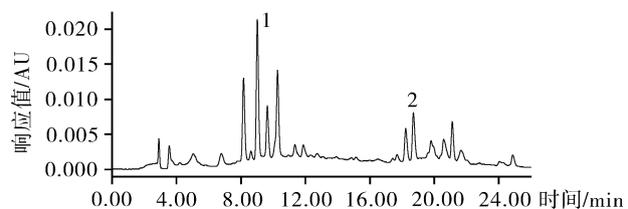
注: 1. 芦丁; 2. 槲皮素。

图 1 芦丁、槲皮素对照品色谱图



注: 1. 芦丁; 2. 槲皮素。

图 2 枫蓼发酵 72 h 色谱图



注: 1. 芦丁; 2. 槲皮素。

图 3 枫蓼未发酵色谱图

2.2.2 对照品溶液的配制 精密称取芦丁、槲皮素对照品 10 mg 于 10 mL 容量瓶中, 甲醇定容至 10 mL, 配置成浓度为 $1 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的储备液, 备用。精密称取芦丁、槲皮素储备液 2.5 mL 于 25 mL 同一容量瓶中, 配制成 $100.0 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 对照品混合液。取混合对照品溶液 0.01、0.1、0.5、1、2 mL 于同一 10 mL 容量瓶中得 0.1、1.0、5.0、10.0、20.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液配制 精密称取枫蓼粉末 5 g, 60 °C 干燥 2 h 后, 加 60% 乙醇 50 mL, 称重, 超声 30 min, 称重并补足之前的重量, 离心, 倒出上清液, 滤渣继续加入 50 mL 60% 乙醇, 其余操作同上, 合并 2 次的上清液, 得到 20 $\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 生药的乙醇提取液。

2.2.4 线性关系考察 精密吸取各浓度混合对照液 10 μL , 注入高效液相色谱仪中测定, 以对照品浓度 X 为横坐标, 峰面积 Y 为纵坐标, 得回归方程: 芦丁 $Y = 20\,875X - 1\,885.8$, $R^2 = 0.999\,8$; 槲皮素 $Y = 32\,354X + 1\,850$, $R^2 = 0.999\,8$, 结果表明在 0.1 ~ 20

$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内线性关系良好。

2.2.5 方法学考察 (1) 日间精密度。取 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合标准品溶液,连续进样 6 次,计算峰面积 RSD 来考察日内精密度,结果显示芦丁、槲皮素的 RSD 值分别为 1.06%、1.48%,表明日内精密度良好。(2) 日间精密度。取 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的标准品溶液连续进样 3 d,每天进样 3 次,计算峰面积的变异系数 RSD 考察日间精密度。结果显示芦丁、槲皮素 RSD 值分别为 0.94%、0.93%,表明日间精密度良好。日间及日内精密度试验结果表明仪器的精密度良好。(3) 稳定性试验。分别于同一供试品溶液放置 0、2、4、6、8、10、24 h 时各精密吸取 $10 \mu\text{L}$ 注入液相色谱仪,测定峰面积,计算芦丁、槲皮素 RSD 值分别为 0.36% 和 0.6%。表明供试品在 24 h 内稳定性良好。(4) 重复性试验。精密称定枫蓼药材 1 g,按“2.4.3”项下方法平行制备 5 份,依法测定各峰面积,计算出芦丁质量分数,得芦丁 RSD 为 1.03%,槲皮素 RSD 值为 1.45%,表明该方法重复性良好。(5) 加样回收率实验。精密称取 5 份已知含量的枫蓼(2:1)粉末 1.0 g,每份加入槲皮素 0.50 mg,按样品处理的操作过程进行提取,进行回收率试验,测得样品芦丁的平均回收率为 99.55%,RSD 为 1.26%;槲皮素含量的平均回收率为 97.86%,RSD 为 1.87%。表明实验准确度良好。

2.3 样品检测 于发酵前和发酵后 24、72、120、168、216 h 时取精密称取枫蓼粉末 1 g,60 °C 干燥 2 h 后,加 60% 乙醇 10 mL,称重,超声 30 min,称重并补足之前的重量,离心,倒出上清液,滤渣继续加入 10 mL 60% 乙醇,其余操作同上,合并两次的上清液,得到 $0.05 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 生药提取液,续滤液经 $0.45 \mu\text{m}$ 的微孔滤膜滤过后精密吸取 $10 \mu\text{L}$ 注入高效液相色谱仪检测。采用外标法计算不同发酵时间下的各组分含量,以发酵前各组分含量为 100%,计算各组分变化百分比,结果见表 1。由表 1 可见,枫蓼发酵 216 h 内,芦丁含量有不同程度的下降,发酵至第 72 小时芦丁含量为 $118.5 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,此后保持在 $70 \sim 80 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 之间,最大降幅约为发酵前的 25.4%;发酵后槲皮素含量整体较发酵前呈先升高后下降的趋势,第 72 小时达到峰值为 $318 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,约为发酵前的 152.2%,表明枫蓼固体发酵 72 h 最佳。

3 讨论

本实验通过绿色木霉发酵枫蓼制剂提高了其槲皮素的含量,且在第 72 小时较发酵前提高约 1.52

表 1 枫蓼制剂发酵前后芦丁、槲皮素含量变化

时间/h	芦丁		槲皮素	
	含量/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	百分比/%	含量/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	百分比/%
发酵前	295.4	100.0	209.0	100.0
24	102.2	34.6	251.0	120.1
72	118.5	40.1	318.0	152.2
120	87.1	29.5	258.0	123.4
168	78.6	26.6	236.0	112.9
216	75.1	25.4	214.0	102.4

注:百分比 = 发酵后含量/发酵前含量。

倍,为应用生物转换技术提高药物有效成分,开发新的制剂工艺提供了实验依据。

实验中曾对比考察液体发酵和固体发酵对枫蓼药材有效成分的影响,分别采用固体和液体发酵枫蓼复方 216 h,分别在第 24、72、120、168、216 小时取样,采用高效液相法测定槲皮素和芦丁含量。结果显示液体发酵后芦丁和槲皮素含量均降低,其中芦丁第 120 小时含量降为发酵前的 40.2%,槲皮素第 120 小时含量降为发酵前的 31.2%。固体发酵后槲皮素和芦丁含量均高于液体发酵,故采用固体发酵枫蓼粉末。

由于中药成分的复杂性,本实验比较了不同的洗脱剂及洗脱梯度对枫蓼制剂中芦丁和槲皮素分离效能的影响。结果表明虽然甲醇能较好的分离样品中的有效成分,但是目标峰出峰时间是乙腈的 1.5 倍,因此洗脱剂用量相应增大,而使用磷酸作为无机相洗脱剂时峰形不够尖锐,且保留时间较长,故选择乙腈和 0.4% 甲酸作为流动相。

芦丁是槲皮素的糖苷,糖苷键在酸作用下易水解,生成鼠李糖和异槲皮苷或槲皮素和芦丁糖,异槲皮苷和芦丁糖进一步水解得到葡萄糖、槲皮素和鼠李糖^[13]。本实验中可见,随着发酵时间延长,芦丁含量呈下降趋势,槲皮素含量呈现逐渐增加的趋势,可能原因是由于绿色木霉发酵枫蓼过程中产生了能够使芦丁转化为槲皮素的酶,具体转化机制需进一步研究。

参考文献

- [1] 张永杰,吴小翠,谢红丹. 枫蓼肠胃康合剂治疗慢性浅表性胃炎的临床观察[J]. 中国热带医学,2013,13(4):476-477,495.
- [2] 洪军,胡晓稳,王佩,等. 槐米中芦丁的提取及抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发,2015,36(15):16-18.
- [3] 吴涛. 芦丁抗疲劳作用的实验研究[D]. 西安:陕西师范大学,2013.
- [4] 孙琛,翟西峰,王力,等. 翻白草总黄酮和芦丁组合物的降血糖作用研究[J]. 中国慢性病预防与控制,2015,23(9):695-697.

脉通胶囊药效学实验研究

葛西航¹, 牛宇东², 王芍²

(1. 陕西大德医药有限公司, 陕西 西安 710075; 2. 西安市食品药品检验所, 陕西 西安 710075)

摘要:目的 通过不同的实验方法和动物模型对脉通胶囊的功能进行验证,为临床合理用药提供依据。**方法** 采用注射胶原蛋白-肾上腺素诱导剂后记录各组小鼠5 min内死亡数和15 min内发生的偏瘫数,观察其体内抗血栓作用;采用大鼠体外血栓形成实验的方法,观察其体外抗血栓作用;采用测定角叉菜胶所致大鼠足趾肿胀度的方法,观察其抗炎作用;采用记录注射醋酸后各组小鼠第一次扭体反应出现时间及15 min内扭体次数的方法,观察其镇痛作用。**结果** 脉通胶囊可明显减少小鼠5 min内死亡数和15 min内出现偏瘫数($P < 0.05$);可明显抑制大鼠体外血栓形成($P < 0.05$);可明显减少致炎大鼠足趾肿胀率($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);可明显延长致痛小鼠第一次扭体发生时间($P < 0.05$)及明显减少扭体次数($P < 0.05$)。**结论** 脉通胶囊具有抗血栓、抗炎镇痛作用。

关键词:脉通胶囊;药效学研究

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2017.02.011

The experimental study of pharmacodynamics Maitong capsule

GE Xihang¹, NIU Yudong², WANG Shao²

(1. Shaanxi Dade Pharmaceutical Co. Ltd, Xi'an, Shaanxi 710075, China;

2. Xi'an Institute for Food and Drug Control, Xi'an, Shaanxi 710075, China)

Abstract: Objective To confirm the functions of maitong capsule by different experimental methods and animal models so as to provide information for rational clinical use of drug. **Methods** *In vivo* anti-thrombotic effects were studied by recording the death number within 5 minutes and the hemiplegia number within 15 minutes of mice in each groups after injecting inductors of collagen and adrenaline. Anti-thrombotic effects was observed using the method of thrombosis of rats *in vitro*. The anti-inflammatory effects was observed by determining carrageen-pastern-induced paw swelling of rats. And the analgesia effects were studied by recording the time of first torsion reaction and the times of the torsion reaction within 15 minutes of mice caused by acetic acid. **Results** Maitong capsule had significantly reduced the death number within 5 minutes and the hemiplegia number within 15 minutes ($P < 0.05$) of mice, significantly inhibited thrombosis of rats *in vitro* ($P < 0.05$), significantly reduced the rates of paw swelling of rats ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and significantly prolonged the time ($P < 0.05$) of first torsion reaction of rats and reduced the times ($P < 0.05$) of the torsion reaction within 15 minutes. **Conclusion** Maitong capsule possesses antithrombotic activity, anti-inflammatory and analgesic effect.

Key words: Maitong capsule; Study of pharmacodynamics

外周动脉闭塞性疾病主要包括血栓闭塞性脉管炎和动脉硬化性闭塞症,是临床上一种常见的难治性疾病。脉通胶囊是临床上专治此类疾病的

纯中药制剂,由丹参、乳香等^[1]组成,具有活血化瘀、通经活络的作用,对此,我们进行了药效学研究。

- [5] WANG P, VADGAMA JV, SAID JW, et al. Enhanced inhibition of prostate cancer xenograft tumor growth by combining quercetin and green tea[J]. *J Nutr Biochem*, 2014, 25(1): 73-80.
- [6] ZHOU F, PAN Y, HUANG Z, et al. Visfatin induces cholesterol accumulation in macrophages through up-regulation of scavenger receptor-A and CD36[J]. *Cell Stress Chaperones*, 2013, 18(5): 643-652.
- [7] 黄敬群, 孙文娟, 王四旺, 等. 槲皮素对大鼠痛性关节炎抗炎抗氧化活性研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(2): 169-173.
- [8] 庄毅. 中药内的生物制药——固体发酵工程系列及其真菌药物[J]. *菌物研究*, 2013, 11(2): 63-71, 88.

- [9] 杨学娟. 纳豆芽孢杆菌固体发酵低温豆粕的功能活性及机制研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2013.
- [10] 王身艳. 药用真菌发酵有毒中药草乌减毒增效基础研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2012.
- [11] 谭彦琦. 北冬虫夏草固体发酵条件对主要活性成分含量影响的研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2013.
- [12] 匡守权. 红曲霉-人参双向固体发酵及其产物药理活性研究[D]. 延吉: 延边大学, 2014.
- [13] 高陪, 苏建, 沈竞, 等. 微生物发酵转化芦丁制备槲皮素的研究[J]. *四川大学学报(自然科学版)*, 2010, 47(6): 1429-1433.

(收稿日期: 2016-07-14, 修回日期: 2016-08-02)