

# 不同来源北冬虫夏草中总黄酮的提取及含量测定

孙晶波, 于晶, 安丽萍, 贾皓, 杜培革

(北华大学 药学院, 吉林 吉林 132013)

**摘要:**以不同来源北冬虫夏草为试材,通过正交实验研究总黄酮的提取工艺,以紫外吸收峰的峰形、位置及强度为标准选定显色试剂及测定波长,确定北冬虫夏草中总黄酮的提取工艺及含量测定方法。结果表明:用40倍量的70%乙醇于90℃水浴中单次回流提取4 h,总黄酮提取率最高;以芦丁为对照品,0.1 mol/L的 $\text{AlCl}_3$ 为显色剂,265 nm为检测波长,测定总黄酮的含量方法最佳;以大米为培养基的北冬虫夏草(米虫草),蚕蛹培养(蛹虫草)的北冬虫夏草子实体、全草及虫体中总黄酮含量分别为3.700 8、4.039 8、3.219 2、2.502 4 mg/g。

**关键词:**北冬虫夏草;总黄酮;紫外分光光度法

**中图分类号:**S 6;S 567.3<sup>+</sup>5 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2015)13-0137-03

北冬虫夏草(*Cordyceps militaris* (L.) Link)又名北虫草、蛹虫草,与名贵中药材冬虫夏草同为虫草属药用真菌。相关研究表明,北冬虫夏草与冬虫夏草中的活性成分种类相同,且北冬虫夏草中主要药效成分虫草素、虫草多糖等均高于冬虫夏草<sup>[1-2]</sup>。相关药理学研究<sup>[2]</sup>也表明了北冬虫夏草具有与冬虫夏草相似或者更好的药用和滋补功能,因此常被作为冬虫夏草的最佳替代品而倍受关注和重视。

北冬虫夏草中具有多种药用成分,研究较多的如虫草酸、虫草素、虫草多糖等,而关于黄酮类化合物<sup>[3-4]</sup>的研究较少。黄酮类化合物也是北冬虫夏草中含量较多的一类成分。黄酮是自然界中分布广泛、药理作用多样的一类化合物,如对心血管系统、神经系统、免疫系统等均具有一定的治疗和保健作用<sup>[5-6]</sup>。因此,试验对不同来源的北冬虫夏草全草、子实体及虫体中黄酮类化合物进行提取工艺及含量测定方法研究,以期能为北冬虫夏草的产业化及下游产品研究与开发提供可靠的科学依据。

**第一作者简介:**孙晶波(1978-),女,博士,副教授,研究方向为药用植物活性成分及其功用。E-mail:sjb781219@163.com。

**责任作者:**杜培革(1964-),女,博士,教授,研究方向为微生物与生化药学。E-mail:2207520094@qq.com。

**基金项目:**吉林市科技计划具有产业化前景的科技创新攻关专项资助项目(201464045),吉林市科技支撑计划农业科技创新专项资助项目(2013222010)。

**收稿日期:**2015-01-21

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试材:北冬虫夏草由吉林省蚕业科学研究院提供。

仪器:SHIMADZU UV-2550 型紫外分光光度计(日本岛津)。

药剂:乙醇、硝酸铝、氯化铝、亚硝酸钠、氢氧化钠等均为市售分析纯试剂。

### 1.2 试验方法

1.2.1 北冬虫夏草样品中总黄酮的提取 以北冬虫夏草中的米虫草为对象,以总黄酮含量为评价指标,采用4因素3水平正交实验方法,优选北冬虫夏草总黄酮的提取工艺,因素水平见表1。

1.2.2 紫外分光光度法测定总黄酮的显色方法及测定波长选择 分别以 $\text{AlCl}_3$ <sup>[7]</sup>和 $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3$ <sup>[8]</sup>法对样品及芦丁标准品溶液进行处理,所得反应体系于190~800 nm范围内进行全波长扫描,分析确定最佳显色方法及测定波长。

表1 因素水平表( $L_9 3^4$ )

Table 1 The factor and level of orthogonal table

| 水平<br>Level | 因素 Factor                             |   |                                |                                       |
|-------------|---------------------------------------|---|--------------------------------|---------------------------------------|
|             | A 乙醇浓度<br>Ethanol concentration<br>/% | B 料液比<br>Ratio of material to<br>liquid/(g·mL <sup>-1</sup> ) | C 提取时间<br>Extraction<br>time/h | D 提取温度<br>Extraction<br>temperature/℃ |
| 1           | 70                                    | 1:20  | 2                              | 80                                    |
| 2           | 80                                    | 1:30  | 3                              | 85                                    |
| 3           | 90                                    | 1:40  | 4                              | 90                                    |

1.2.3 标准曲线的制备 精密称取 5 mg 芦丁标准品于 25 mL 容量瓶中,加适量 60%乙醇溶解后定容,摇匀。精密吸取 0.0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL,分别置于 10 mL 容量瓶中,分别加入 0.1 mol/L 氯化铝溶液 0.1 mL,摇匀,用 60%乙醇稀释至刻度,摇匀,静置 10 min。以 0 号做空白,分别在 265 nm 处测定吸光度,绘制标准曲线,得到回归方程  $A=38.390C+0.0443$ ,  $r=0.9999$ 。表明芦丁含量在 0.00~0.05 mg/mL 与吸光度呈良好的线性关系。

1.2.4 样品的制备及含量测定 精密称取不同来源的北冬虫夏草:米虫草、蛹虫草全草、蛹虫草虫体及子实体各 1.00 g,置于圆底烧瓶中,按 1:40 比例加入 70%乙醇,90℃回流 4 h,过滤后用 60%乙醇定容至 25 mL,从中精密量取 0.1 mL 按标准品制备方法制备样品溶液,测定吸光度,根据回归方程得出样品溶液中总黄酮的浓度,计算出原料样品中总黄酮的含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 显色方法及测定波长的确定

乙醇的渗透能力强,提取范围广,对各种不同类型的黄酮类化合物都具有较好的提取效果,因此该研究选用了乙醇为提取剂。但不同结构类型的黄酮类化合物,其理化性质不同,与金属离子形成络合物的能力及稳定性也不同。通过比较  $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3$  与  $\text{AlCl}_3$  法的紫外全波长扫描图谱,前者所得图谱峰多而杂,而且在常规检测波长 510 nm 处无明显吸收峰;后者处理后的样品及标准品溶液均在 265 nm 处有较强的吸收峰,且峰形好、吸收峰较强,而且样品处理方法相对于前者更简便、快速,其测定结果稳定、可靠,可作为北冬虫夏草中总黄酮的样品显色及含量测定方法。

### 2.2 正交实验结果及分析

由表 2 可知,各因素对提取率影响的主次为:提取温度(D)>提取时间(C)>料液比(B)>乙醇浓度(A)。最佳因素水平组合为  $A_1B_3C_3D_3$ ,即乙醇浓度 70%,料液比 1:40 g/mL,提取时间 4 h,提取温度 90℃的条件下总黄酮提取率最高,为 3.695 5 mg/g。对该最佳提取条件进行 3 次平行验证试验,3 次平均提取率为 3.702 1 mg/g,说明该提取方法稳定可行。

### 2.3 样品含量测定结果及分析

采用最佳提取工艺提取米虫草、蛹虫草子实体、全草及其虫体中的总黄酮,以  $\text{AlCl}_3$  法处理后,于 265 nm 处测定其吸光度,依回归方程计算含量,得到各原料中总黄酮含量分别为 3.700 8、4.039 8、3.219 2、2.502 4 mg/g。其中米虫草与蛹虫草子实体中总黄酮含量相近,而且均远高于虫体中总黄酮的含量。以大米为培养基培养北冬虫

夏草,培养方法更简单、价廉、易得,相对优于蚕蛹培养法<sup>[8-9]</sup>,用过的大米培养基还可做它用,使资源利用充分,减少废弃物的产生。

表 2 正交实验结果

Table 2 The results of the orthogonal test

| 试验编号<br>Test No. | 因素 Factor |          |          |          | 含量 Content<br>/(mg·g <sup>-1</sup> ) |
|------------------|-----------|----------|----------|----------|--------------------------------------|
|                  | A         | B        | C        | D        |                                      |
| 1                | 1         | 1        | 1        | 1        | 2.438 7                              |
| 2                | 1         | 2        | 2        | 2        | 2.979 2                              |
| 3                | 1         | 3        | 3        | 3        | 3.695 5                              |
| 4                | 2         | 1        | 2        | 3        | 3.011 7                              |
| 5                | 2         | 2        | 3        | 1        | 3.591 3                              |
| 6                | 2         | 3        | 1        | 2        | 3.200 6                              |
| 7                | 3         | 1        | 3        | 2        | 2.842 4                              |
| 8                | 3         | 2        | 1        | 3        | 3.467 6                              |
| 9                | 3         | 3        | 2        | 1        | 2.230 3                              |
| $T_1$            | 9.113 4   | 8.292 8  | 9.106 9  | 8.260 3  |                                      |
| $T_2$            | 9.803 6   | 10.038 1 | 8.221 2  | 9.022 2  |                                      |
| $T_3$            | 8.540 3   | 9.126 4  | 10.129 2 | 10.174 8 | $D>C>B>A$                            |
| $X_1$            | 3.037 8   | 2.764 3  | 3.035 6  | 2.753 4  | $A_1B_3C_3D_3$                       |
| $X_2$            | 3.267 9   | 3.346 0  | 2.740 4  | 3.007 4  |                                      |
| $X_3$            | 2.846 8   | 3.042 1  | 3.376 4  | 3.391 6  |                                      |
| R                | 0.421 1   | 0.581 8  | 0.636 0  | 0.638 2  |                                      |

## 3 结论

该研究通过正交实验法研究确定了影响北冬虫夏草中总黄酮提取的因素:提取温度>提取时间>料液比>乙醇浓度,并确定最佳提取工艺为:提取温度为 90℃、提取时间 4 h、料液比 1:40 g/mL、乙醇浓度 70%。通过  $\text{AlCl}_3\text{-UV}$  法对米虫草和蛹虫草不同部位总黄酮的含量测定,总黄酮含量依次为:蛹虫草子实体>米虫草>蛹虫草全草>虫体。

### 参考文献

- [1] 张姝,张永杰,Shrestha B,等.冬虫夏草菌和蛹虫草菌的研究现状、问题及展望[J].菌物学报,2013,32(4):577-597.
- [2] 杨瑞玲.冬虫夏草与蛹虫草异同点比较[J].食用菌,2012(3):4-5,9.
- [3] 刘春泉,韩晨,李大婧,等.微波法提取北冬虫夏草中黄酮类化合物[J].江苏农业学报,2007,23(4):356-359.
- [4] 陈晓侠,宋渊,张纪柏,等.吸附树脂对蛹虫草中黄酮纯化工艺条件优化[J/OL].食品科学,2014. <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20141022.1615.069.html>.
- [5] Jiang Y, Wong J H, Fu M, et al. Isolation of adenosine, iso-sinensetin and dimethylguanosine with antioxidant and HIV-1 protease inhibiting activities from fruiting bodies of *Cordyceps militaris* [J]. Phytomedicine, 2011, 18(2-3): 189-193.
- [6] 李楠,刘元,侯滨滨.黄酮类化合物的功能特性[J].食品研究与开发,2005,26(6):139-141.
- [7] 陈晓侠,屠幼英,徐懿,等.饮用干花中微量元素和黄酮类含量的分析[J].食品工业科技,2006,27(10):175-177.
- [8] 郭涛,张龙,王兵,等.不同培养基培育蛹虫草中的虫草素和腺苷含量测定[J].蚕业科学,2011,37(6):1117-1122.
- [9] 秦秀丽,邢力,尹锐.北冬虫夏草人工培养基固体培养基优化研究[J].北方园艺,2013,37(6):149-152.

# 干湿分离奶牛粪制备培养基生产双孢菇对比试验

李和平<sup>1</sup>, 任俊玲<sup>1</sup>, 吴广军<sup>2</sup>, 邱殿锐<sup>2</sup>, 赵伍祥<sup>2</sup>, 刘瑞臣<sup>3</sup>

(1. 河北旅游职业学院 畜牧兽医系, 河北 承德 067000; 2. 承德市畜牧研究所, 河北 承德 067000; 3. 隆化县农牧局, 河北 承德 068150)

**摘要:**以稻草为主料, 分别以干湿分离奶牛粪、草原肉牛粪、鸡粪为辅料, 制作培养基生产双孢菇, 比较 3 种培养基对双孢菇菌丝和子实体生长、双孢菇营养品质、单产、生物学效率和经济效率的影响, 研究利用干湿分离奶牛粪生产双孢菇的可行性。结果表明: 干湿分离奶牛粪组子实体容重高于其余 2 组, 与草原肉牛粪组差异极显著 ( $P < 0.01$ ), 其它指标差异不显著 ( $P > 0.05$ )。试验表明利用干湿分离奶牛粪制备培养基生产双孢菇是可行的, 值得应用推广。

**关键词:**双孢菇; 干湿分离奶牛粪; 对比试验

**中图分类号:**S 646.1<sup>+</sup>41 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)13-0139-03

随着奶牛养殖的迅速发展, 奶牛粪便对环境造成的污染越来越引起大家的关注。奶牛粪便的科学处理和有效利用迫在眉睫。利用奶牛粪生产双孢菇就是科学处理奶牛粪的探索方法之一。双孢菇通常生长在腐熟的有机质上, 称草腐菌或草生菌, 实质上是粪生菌, 具有较高的营养和经济价值。该研究用干湿分离奶牛粪制备双孢菇培养基进行对比试验, 探寻其利用可行性。

**第一作者简介:**李和平(1979-), 男, 硕士, 讲师, 现主要从事临床兽医学教学与研究工作。E-mail: liheping9904@126.com

**责任作者:**邱殿锐(1964-), 男, 本科, 研究员, 现主要从事畜牧生产相关技术研究工作。E-mail: qdrui@sina.com

**基金项目:**河北省现代农业产业技术体系奶牛产业创新团队建设专项资助项目; 承德市科学技术研究与发展计划资助项目(201422076)。

**收稿日期:**2015-03-20

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

双孢菇温房主体采用聚苯泡沫板, 栽培架上下 7 层。稻草自然晒干备用。将经干湿分离机分离的含水量 72%~75% 奶牛粪、新鲜鸡粪分别堆积在堆粪场上, 堆积高度为 10~15 cm, 晾晒至含水量 30% 以下备用, 所得奶牛粪称作干湿分离奶牛粪。收集自然干燥草原肉牛粪备用。尿素、磷肥、石膏粉等购于承德市农资经销处。双孢菇菌株 NS2796。脂肪测定仪、定氮仪、可见光分光光度计等。盐酸、石油醚、硅藻土、硫酸等。

### 1.2 试验方法

试验在承德县春民食用菌种植专业合作社进行。试验分为干湿分离奶牛粪组、草原肉牛粪组、鸡粪组, 每组设 3 次重复, 每重复 7.2 m<sup>2</sup>, 各组按照表 1 配方建堆。

## Extraction and Determination of Total Flavonoids From *Cordyceps militaris* Clutrued by Different Cultural Medium

SUN Jingbo, YU Jing, AN Liping, JIA Hao, DU Peige  
(Pharmaceutical College, Beihua University, Jilin, Jilin 132013)

**Abstract:** Taking *Cordyceps militaris* from different sources as test materials, the extraction technology of total flavonoids in *C. militaris* was optimized by orthogonal test, the chromogenic agent and the determine wavelength selection depended on the shapes, positions and intensity of UV absorbance bands. The results showed that total flavonoids content in *C. militaris* was the highest when refluxed extracted with 40 times of 70% alcohol for 4 hours (90°C), and then determined by UV at 265 nm after being treated with 0.1 mol/L AlCl<sub>3</sub>. The total flavonoids contents in *C. militaris* growing on rice medium, and in fruit bodies, whole grass, pupa body of *C. militaris* growing on silkworm pupa were 3.700 8 mg/g, 4.039 8 mg/g, 3.219 2 mg/g, 2.502 4 mg/g, respectively.

**Keywords:** *Cordyceps militaris*; total flavonoids; ultraviolet spectroscopy