

文章编号: 1000-5692(2002)02-0157-04

竹黄竹红菌甲素含量测定方法

林海萍¹, 陈虹¹, 叶勇¹, 吴林森²

(1. 浙江林学院 生命科学学院, 浙江 临安 311300; 2. 丽水师范专科学校 职业技术学院, 浙江 丽水 323800)

摘要: 为了掌握竹红菌甲素的测定方法, 测得了竹红菌甲素吸收曲线, 研究了不同体质分数乙醇溶液浸提、不同浸提时间、竹黄子座不同颗粒度和不同乙醇用量对竹红菌甲素提取效果的影响。结果表明, 竹黄子座中竹红菌甲素含量最佳测定方法是将颗粒度为 $0.1 \text{ g} \cdot \text{颗}^{-1}$ 的竹黄子座风干品 10 颗浸泡于 100 mL 无水乙醇中, 8 d 后, 稀释 10 倍, 于 465 nm 波长下测定吸光度。图 1 表 3 参 14

关键词: 竹黄; 竹红菌甲素; 测定方法; 吸光度

中图分类号: Q949.32 **文献标识码:** A

竹红菌甲素 (hypocrellin A) 是名贵野生药用真菌竹黄 *Shiraia bambusicola* 的主要有效成分。竹黄菌隶属于子囊菌亚门 Ascomycotina, 核菌纲 Pyrenomyces 球壳目 Sphaeriales 肉座菌科 Hypocreaceae 竹黄属 *Shiraia*^[1,2]。常寄生在短穗竹 *Semiarundinaria densiflora*、苦竹 *Pleioblastus amarus*、雷竹 *Phyllostachys praecox* 和箬竹 *Phyllostachys nidularia* 等的枝秆上。近年来, 竹黄越来越引起国内外学者的重视, 对其进行了化学成分^[3]、药理作用^[4~6]和临床应用^[7]等方面的研究。结果表明竹黄具有营气卫血, 破瘀止痛, 促进新陈代谢, 增强体质等功能^[8,9]。

竹黄的有效药用成分竹红菌甲素更是倍受关注, 它是一种醌类光动力学色素, 也是一种新型的光化学疗法药物^[10], 经药理实验与临床应用, 显示了较强的生理活性和药理作用。其主要药理作用有镇痛、抗炎、抗菌、抗癌、护肝和保护心血管^[11,12]等。竹红菌甲素的含量是衡量竹黄品质的重要指标, 但很少有人研究竹黄竹红菌甲素含量测定方法, 仅有吕孝敢等^[13]报道竹黄乙醇溶液在 465 nm 波长下有最大吸收, 且其他成分在这一波长下无干扰, 可借以定量。该报道没有说明乙醇体积分数与用量, 也没有说明竹黄浸提时间与颗粒度, 而这些因素都直接影响测定结果。本文旨在摸索出竹黄子座中竹红菌甲素含量测定的具体可操作性方法, 为竹黄品质鉴定、优良菌株选育和人工培养等研究工作奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 竹黄子座 2001 年 5 月 1 日, 在临安九仙山短穗竹上人工采集野生竹黄子座, 于室内通风处风干, 注意防霉和避免阳光曝晒。

1.1.2 竹红菌甲素浸提试剂 无水乙醇, 分析纯。

收稿日期: 2001-06-29; 修回日期: 2001-11-05

作者简介: 林海萍(1973-), 女, 浙江黄岩人, 讲师, 从事微生物食品和药品加工研究。

1.2 实验方法

1.2.1 确定测定波长 将1 g (10×0.1 g) 竹黄子座风干品浸入100 mL 无水乙醇中, 分别在325~630 nm 波长下(7230G型分光光度计)每隔5 nm 测定吸光度, 以获得竹红菌甲素吸收曲线, 并确定测定波长。

1.2.2 确定浸提试剂体积分数与测定时间 将1 g (10×0.1 g) 竹黄子座风干品浸入100 mL 体积分数为30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%与100%乙醇溶液(无水乙醇)中, 浸提4 h, 12 h, 24 h, 26 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h, 168 h, 192 h, 216 h 和240 h 后稀释10倍, 在465 nm 波长下测定吸光度。通过比较吸光度, 选择一个最佳的提取时间和提取溶剂浓度。

1.2.3 确定浸提颗粒度 采用2×0.5 g, 4×0.25 g, 10×0.1 g 和粉状(将竹黄风干品磨成粉后, 用棉布包好) 4个不同颗粒度组成1 g 竹黄, 分别浸入100 mL 无水乙醇中, 浸提4 h, 12 h, 36 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h, 168 h, 192 h, 216 h 和240 h, 后稀释10倍在465 nm 波长下测定吸光度。通过比较吸光度, 选择最佳浸提颗粒度。

1.2.4 确定浸提试剂用量 将1 g (10×0.1 g) 竹黄子座风干品浸入50 mL, 75 mL, 100 mL, 125 mL 和150 mL 无水乙醇中, 浸提4 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h, 168 h, 192 h, 216 h 和240 h 后, 稀释10倍, 在465 nm 波长下测定吸光度, 确定最佳浸提试剂用量。

2 结果与分析

2.1 吸收波长对吸光度的影响

由图1可见, 竹红菌甲素在波长465 nm 处有一最大吸收峰, 此吸收曲线与万象义等^[14]测定的竹红菌甲素吸收曲线一致, 所以确定465 nm 为竹红菌甲素含量测定波长。

2.2 不同体质分数乙醇, 不同提取时间对竹红菌甲素提取效果的影响

由表1可以看出, 乙醇体积分数越高, 竹红菌甲素的提取效果越好, 因为竹红菌甲素为脂溶性色素, 能溶于乙醇等有机溶剂而不溶于水。100%乙醇(即无水乙醇)作为浸提试剂提取效果明显比其他浓度乙醇溶液好, 且无水乙醇易于回收, 有利于下一步竹红菌甲素的分离提纯且节约实验费用。在192 h(即8 d)吸光度达到最高值, 如继续浸提, 则吸光度略有下降。我们将浸提了240 h(10 d)后的浸提液过滤, 将竹黄子座颗粒继续浸于新的无水乙醇中, 除最初浸于无水乙醇的竹黄子座颗粒浸提液吸光度约等于0(可忽略)外, 其他浸提液均仍有竹红菌甲素溶出。所以我们选择无水乙醇浸泡竹黄8 d后测定吸光度。

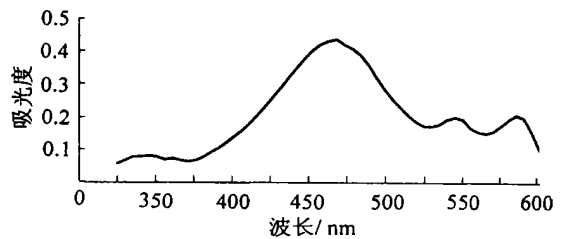


图1 竹红菌甲素吸收曲线
Figure 1 The absorbing curve of hypocrellin A

2.3 不同颗粒度对竹红菌甲素提取效果的影响

由表2可见除粉状样品外, 竹黄颗粒度越小, 则乙醇对其所含的竹红菌甲素的提取效果越好。粉状样品虽然提取速度最快, 但34 h后反而落后于0.1 g·颗⁻¹的样品。这可能是由于用棉布包住样品, 会有一部分竹红菌甲素被棉布吸收, 从而使吸光度下降。而如不用棉布将竹黄粉包起来, 则测定时必须过滤, 也会有一部分竹红菌甲素损失, 从而影响测定准确性。我们将0.1 g·颗⁻¹的样品浸提了240 h(10 d)后的浸提液过滤, 将竹黄子座颗粒继续浸于新的无水乙醇中, 8 d后测定浸提液吸光度约等于0(可忽略)。所以我们选择0.1 g·颗⁻¹作为测定的颗粒度。

2.4 不同乙醇用量对竹红菌甲素提取效果的影响

由表3可得到, 将1 g (10×0.1 g) 竹黄子座风干品浸入100 mL, 125 mL 与150 mL 无水乙醇中, 经换算成相同乙醇体积, 96 h后浸提液吸光度无明显差别。而浸入75 mL 和50 mL 无水乙醇中, 经换算成相同乙醇体积, 浸提液吸光度明显较小。所以选择将1 g (10×0.1 g) 竹黄子座风干品浸入100 mL 无水乙醇中能得到准确的测定结果, 且最节约实验经费。

表 1 不同体积分数乙醇溶液, 不同浸提时间对竹红菌甲素提取效果的影响

Table 1 Effect of varied alcohol liquor's concentration and immersed time on the distill impact of hypocrellin A

浸提时间/h	不同乙醇体积分数下浸提液的吸光度							
	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	100%
4	0.0211	0.0289	0.0410	0.0619	0.0523	0.0705	0.0972	0.1603
10	0.0250	0.0458	0.0731	0.1132	0.0942	0.1344	0.1776	0.2699
22	0.0408	0.0710	0.1533	0.1829	0.1417	0.1962	0.2581	0.3733
34	0.0482	0.0904	0.1803	0.2696	0.2333	0.2761	0.2976	0.4317
48	0.0541	0.1093	0.1699	0.3006	0.2635	0.3135	0.3157	0.4528
72	0.0594	0.1672	0.2328	0.3316	0.2952	0.3088	0.3328	0.4699
96	0.0712	0.1952	0.2557	0.3744	0.3228	0.3535	0.3435	0.4685
120	0.0700	0.1952	0.2939	0.3883	0.3474	0.3690	0.03520	0.4728
144	0.0744	0.2324	0.2969	0.4033	0.3602	0.3711	0.3429	0.4837
168	0.0776	0.2376	0.3060	0.4167	0.3684	0.3872	0.3589	0.4847
192	0.0797	0.2469	0.2893	0.4161	0.3668	0.3924	0.3531	0.4934
216	0.0804	0.2749	0.3117	0.4113	0.3858	0.3820	0.3611	0.4929
240	0.0798	0.2708	0.3071	0.4204	0.3750	0.3862	0.3552	0.4793

表 2 竹黄不同颗粒度对竹红菌甲素提取效果的影响

Table 2 Effect of varied stomata's granularity on the distill impact of hypocrellin A

浸提时间/h	不同竹黄颗粒度下浸提液的吸光度			
	0.5 g·颗 ⁻¹	0.25 g·颗 ⁻¹	0.1 g·颗 ⁻¹	粉状
4	0.1238	0.1567	0.1603	0.3851
10	0.2295	0.2898	0.2699	0.3975
22	0.2580	0.3586	0.3733	0.4113
34	0.3060	0.3665	0.4317	0.4095
48	0.2814	0.3803	0.4528	0.4169
72	0.2909	0.3783	0.4699	0.4055
96	0.2987	0.3867	0.4685	0.4209
120	0.3031	0.3966	0.4728	0.4274
144	0.3149	0.3956	0.4837	0.4323
168	0.3071	0.3998	0.4847	0.4254
192	0.3105	0.3887	0.4934	0.4274
216	0.3032	0.3773	0.4929	0.4050
240	0.2904	0.3749	0.4793	0.4114

表 3 不同乙醇用量对竹红菌甲素提取效果的影响

Table 3 Effect of varied alcohol's dosage on the distill impact of Hypocrellin A

浸提时间/h	不同乙醇用量下浸提液的吸光度				
	50 mL	75 mL	100 mL	125 mL	150 mL
4	0.1238	0.1488	0.1603	0.2235	0.2544
10	0.2295	0.2595	0.2691	0.2898	0.3251
22	0.2580	0.2911	0.3737	0.3814	0.3975
34	0.2817	0.3166	0.4317	0.4423	0.4587
48	0.2814	0.3241	0.4528	0.4629	0.4656
72	0.2909	0.3211	0.4685	0.4562	0.4835
96	0.2987	0.3563	0.4699	0.4695	0.4638
120	0.3031	0.3732	0.4728	0.4869	0.4825
144	0.3149	0.3846	0.4837	0.4903	0.4888
168	0.3071	0.4011	0.4847	0.4756	0.4820
192	0.3105	0.4304	0.4934	0.4928	0.4897
216	0.3032	0.4219	0.4927	0.4928	0.4921
240	0.2984	0.4083	0.4865	0.4836	0.4799

3 结论

通过以上实验, 得到竹黄子座中竹红菌甲素含量测定方法: 以 1 g (10×0.1 g) 竹黄子座风干品在 100 mL 无水乙醇中浸泡 8 d 后, 稀释 10 倍, 465 nm 波长测定吸光度。

由于竹红菌甲素不溶于水, 所以竹黄子座必须经过风干后, 才能进行竹红菌甲素含量测定, 否则会影响测定准确性。如果天气干燥, 竹黄子座可以直接在空气中风干, 注意避免阳光曝晒; 如果在潮湿的季节, 则可将竹黄子座在低于 60 °C 的恒温干燥箱中烘干。如不马上进行测定, 应将竹黄子座入冰箱冷藏室中储藏。

4 讨论

本文所得测定方法比前人研究结果更为具体, 有较强的可操作性。

在研究中发现竹黄不同个体及同一个体的不同部位竹红菌甲素含量有一些差异, 但似乎又无规律可循, 因此本文在研究中将它们都同等对待。这必定给实验结果带来一定的误差。在今后的研究中应找出差别的规律, 以便取样更加科学。

参考文献:

- [1] 上海农业科学院食用菌研究所. 中国食用菌志[M]. 北京: 中国林业出版社, 1991. 16.
- [2] 陈士瑜. 17种药用真菌的栽培[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999. 1-2.
- [3] 王景祥, 张黎明, 朱丽青. 竹黄化学成分的研究[J]. 中草药, 1990, 21(7): 4-5.
- [4] 王景祥, 何祖泽, 朱丽青, 等. 竹红菌乙素对小鼠肝癌H₂₂的抑制作用[J]. 中国药理学通报, 1997, 13(2): 188-189.
- [5] 傅乃武, 黄磊, 全兰萍, 等. 竹红菌甲素对小鼠红细胞膜的光氧化作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1990, 4(1): 75-77.
- [6] 万阜昌. 真菌竹黄对心血管等作用的研究[J]. 中药通报, 1982, 7(5): 31-33.
- [7] 于兰馥, 罗子华, 张胜泉. 竹红菌软膏加光疗治疗外阴白色病变与其组织变化的研究[J]. 中国妇产科杂志, 1984, 19(1): 29-31.
- [8] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海: 上海人民出版社, 1977. 902.
- [9] 陈士瑜. 菇菌生产技术全书[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998. 778-779.
- [10] Kishi T. New perylenequinones from *Shiraia bambusicola* [J]. *Plant Med*, 1991, 57(4): 376-381.
- [11] Marx J L. Oxygen Free Radical Linked to Many Disease [J]. *Science*, 1987, 235(4788): 529-533.
- [12] Lipson R L. The use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection [J]. *Cancer Inst*, 1961, (26): 1-11.
- [13] 吕孝敢, 王菊英. 竹红菌甲素的分光光度测定法[J]. 药物分析杂志, 1983, 3(1): 42-43.
- [14] 万象义, 陈远腾. 一种新的光化学疗法药物——竹红菌甲素[J]. 科学通报, 1980, 25(24): 149-152.

Determining method for content of hypocrellin A in *Shiraia bambusicola*

LIN Hai-ping¹, CHEN Hong¹, YE Yong¹, WU Lin-sen²

(1. Faculty of Life Science, Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300, Zhejiang, China; 2. Professional Technology College, Lishui Teachers College, Lishui 323800, Zhejiang, China)

Abstract: The absorbing curve of hypocrellin A and effect of alcohol concentrations, immersed time, stomata granularities, alcohol dosages on the extraction of hypocrellin A were studied in the paper. The results showed that the best scheme of determining the content of hypocrellin A in *Shiraia bambusicola* stomata was 1 g of air-dried stomata of *Shiraia bambusicola* (each pellet weights 0.1 g, amount to 10 pellets were saturated by 100 mL of Et-OH). Then we dilute the extract by 10 times and determine the absorption at the wavelength of 465 nm after 8 days.

Key words: *Shiraia bambusicola*; hypocrellin A; determining method; extinction