

研究快报

竹红菌中竹红菌乙素的提取及其含量的测定

周 林¹, 董 平², 宋开玺³, 曾 雄³, 顾晓天³, 魏少华³, 冯玉英³, 周家宏³

(1. 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210097)
(2. 江苏省计量科学研究院, 江苏 南京 210007)
(3. 江苏省生物医药功能材料工程研究中心, 江苏 南京 210097)

[关键词] 竹红菌, 竹红菌乙素, 含量, 高效液相色谱
[中图分类号] O657 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2007)02-0122-03

0 引言

竹红菌 (*hypocrella bambusae*) 系子囊菌纲肉座菌科竹寄生真菌, 生长在海拔 3 000 ~ 3 500 m 的高寒区箭竹上, 主要产地为我国云南省和四川省。从竹红菌中提取出的竹红菌素 (Hypocrellin) 主要有竹红菌甲素 (Hypocrellin A) 和竹红菌乙素 (Hypocrellin B), 其中竹红菌乙素结构如图 1。目前竹红菌素已应用于临床治疗肥厚性瘢痕、皮肤淀粉样苔藓、牛皮癣、白癜风等皮肤病^[1]。另外, 竹红菌素还拥有优良的光动力性质, 它与传统的光疗药物相比, 拥有单线态氧量子产率高、能对癌变组织有选择性地吸附、易得和易纯化等优点, 并且对癌细胞具有明显的抑制作用^[2], 从而引起国内外从事光动力疗法研究领域的研究工作者的重视。

研究结果表明, 无论是从光敏活性, 还是从光疗效果来比较, 竹红菌乙素均要优于竹红菌甲素, 因此近年来有关竹红菌素的研究绝大多数都是围绕竹红菌乙素来进行, 这显示竹红菌乙素在光动力疗法领域中具有良好的应用前景^[3-7]。由于竹红菌中竹红菌乙素的含量低于竹红菌甲素, 目前人们主要是将竹红菌中的竹红菌甲素在碱性条件下进行转变来得到竹红菌乙素^[8], 而不是直接从竹红菌中提取竹红菌乙素, 这使得竹红菌中竹红菌乙素的定量分析研究到目前为止尚未见到报道, 另外, 这样只提取竹红菌甲素的做法在一定程度上也造成了资源的浪费。因此, 本课题组在前期准确地测定了竹红菌中竹红菌甲素含量的基础上^[9], 提取并分离出竹红菌中的竹红菌乙素, 探索提取的最佳时间, 以及对其的含量进行了确定, 以期推动竹红菌的应用化进程。

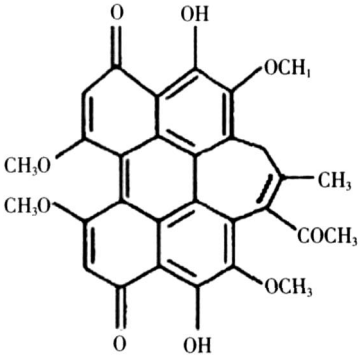


图 1 竹红菌乙素分子结构
Fig.1 Structure of hypocrellin B

1 实验部分

1.1 试剂

乙腈为色谱纯 (Merck 公司), 其它试剂均为分析纯, 水为超纯去离子水。竹红菌甲素和竹红菌乙素对照品由中国科学院理化技术研究所制备, 纯度在 96% 以上。

1.2 仪器

样品的红外光谱用 Nicolet Nexus 670 型红外光谱仪测定, 核磁共振用 Bruker 公司 AV - 400 核磁共振

收稿日期: 2007-01-09, 修回日期: 2007-02-28
基金项目: 国家自然科学基金 (20603018)、江苏省教育厅自然科学基金 (04KJB150068) 资助项目。
作者简介: 周 林 (1981—), 女, 硕士研究生, 主要从事天然菌种中活性成分的学习与研究。E-mail: ndzl@tom.com
通讯联系人: 周家宏 (1972—), 副教授, 主要从事光化学的教学与研究。E-mail: zhoujiahong@njnu.edu.cn

仪,采用氘代氯仿为溶剂,四甲基硅烷(TMS)为内标.紫外可见吸收光谱和荧光光谱分别采用 Varian公司 Cary 50型紫外可见光谱仪和 Varian公司 Cary Eclipse型荧光光谱仪测定.高效液相色谱采用 Agilent 1100型高效液相色谱仪测定.配备二级管阵列检测器及色谱工作站、H66025T超声清洗机.

所有的实验均在室温下进行.

1.3 色谱条件

色谱柱为: Zorbax Extend - C18 column (4.6 mm ID ×150 mm, 5 μm), 柱温: 30 °C; 流动相为: 乙腈 - KH₂PO₄ (0.02 mmol/L) (体积比 70 : 30), 流速: 1.0 mL/min; 紫外检测波长: 300 nm; 进样量: 5 μL. 在此条件下,竹红菌甲素标准品的保留时间在 4.7 min左右,竹红菌乙素标准品的保留时间在 5.6 min左右.

1.4 标准溶液的配制

准确称取 5 mg竹红菌甲素及 1 mg竹红菌乙素分别置 100 mL量瓶中,用乙醇定容,用超声分散至完全溶解,再逐级用乙醇稀释至所需浓度.

1.5 样品前处理

准确称取已干燥粉碎的竹红菌样品约 1 700 mg,加入乙醇 500 mL,称重,于避光条件下在 70 °C水浴中锁式回流,回流 7 h后,以 1 h的时间间隔提取样品进行 HPLC分析.样品冷却后加乙醇补足减失质量,摇匀后过滤.滤液过 0.45 μm微孔滤膜后进行分析.

1.6 化合物的提取和分离

将乙醇回流样品旋转蒸干得 0.12 g粗提物,为暗红色粘稠状液体,粗提物加 10 g青岛海洋化工厂生产的柱层析硅胶拌匀,湿法上柱.冲洗液为梯度 CHCl₃ - CH₃OH (100 : 1、70 : 1、50 : 1),得到紫红色结晶 和 紫红色结晶 .

2 结果与讨论

2.1 光谱确证

紫外可见光谱检测的结果表明,在 300 ~ 800 nm的范围内,紫红色结晶 的二甲基亚砜(DMSO)溶液有 4个特征吸收峰,分别位于 334 nm、461 nm、547 nm和 585 nm;紫红色结晶 的甲醇溶液也有 4个特征吸收峰,分别位于 337 nm、466 nm、552 nm和 590 nm(图 2).对照标样的紫外可见吸收光谱可得知,紫红色结晶 是竹红菌甲素,紫红色结晶 是竹红菌乙素.

紫红色结晶 在二甲基亚砜溶液中测得的荧光光谱显示其在 400 ~ 800 nm的扫描范围内有一个特征发射峰,其峰值位于 618 nm左右处.红外光谱的主要峰值为: 3 451、2 938、1 693、1 611、1 526、1 456、1 285、1 223、1 156、991和 835 cm⁻¹.核磁共振波谱的氢谱结果为 (ppm): 16.07 (1H)、15.97 (1H)、6.57 (1H)、6.56 (1H)、4.27 (3H)、4.18 (3H)、4.08 (1H)、3.18 (3H)、3.73 (3H)、3.65 (2H)、2.18 (3H)、1.78 (3H).与标样检测的结果和文献中的数据相对比,荧光光谱、红外光谱和核磁共振波谱的实验结果同样确证上述的结论.

2.2 HPLC结果及含量分析

根据本课题组前期研究工作所获得的采样条件,我们首先对竹红菌乙素的标样进行 HPLC检测,发现其出峰时间为 5.6 min左右(图 3中的 A).然后我们对不同提取时间的提取液进行现场 HPLC检测(图 3中的 B),结果发现当提取时间为 14 h的时候,竹红菌乙素在 HPLC图谱中的积分面积达到最大值.这说明从 1 700 mg的竹红菌中提取竹红菌乙素的最佳时间为 14 h 另外,在本实验条件下,竹红菌甲素的出峰时间为 4.7 min左右,因此通过对实验所得数据进行处理和分析可以得知,竹红菌中竹红菌甲素的含量为 30.1 mg/g,竹红菌乙素的含量为 2.4 mg/g

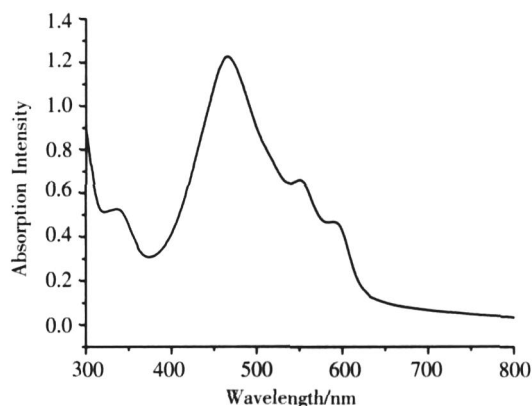


图 2 竹红菌乙素在 DMSO 中的紫外-可见吸收光谱
Fig.2 UV-vis absorption spectra of hypocrellin B in DMSO

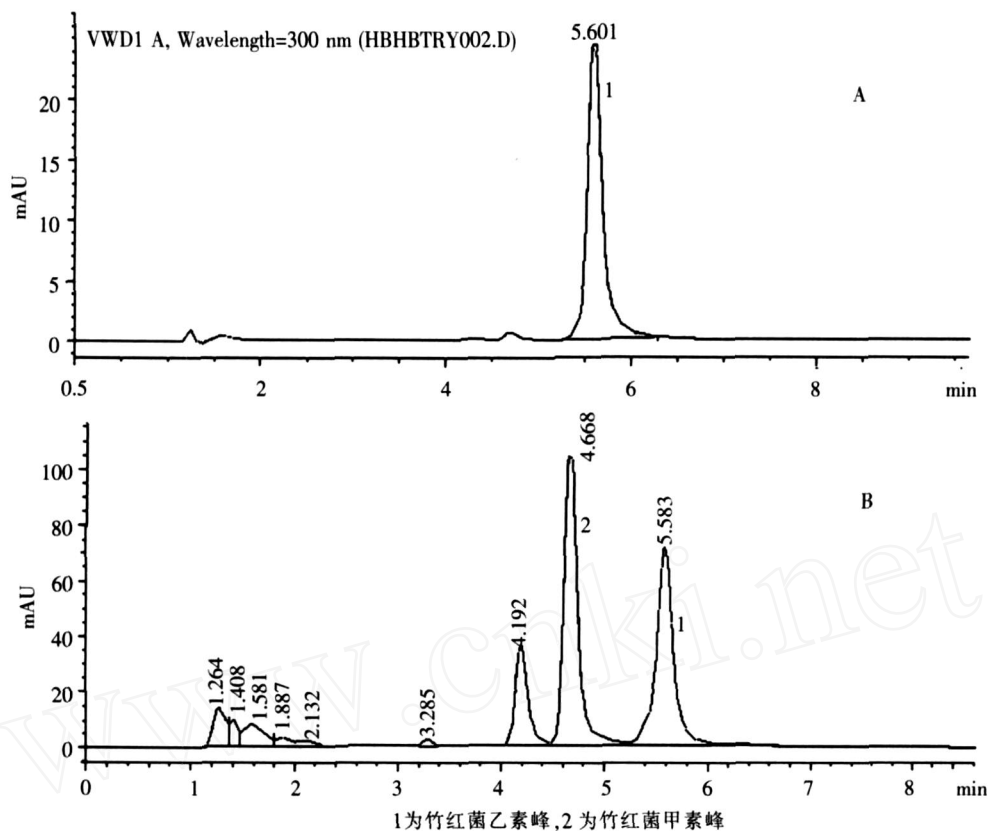


图 3 竹红菌乙素标准品(A)、竹红菌提取液样品(B) 的液相色谱图
Fig.3 HPLC chromatogram of standard HB(A) and extracted HB solution (B)

3 结 论

在对竹红菌提取液中竹红菌乙素表征的基础上,利用 HPLC对提取液进行现场检测,得知从 1 700 mg 的竹红菌中提取竹红菌乙素的^{最佳提取时间在本实验条件下为 14 h,同时还确定竹红菌乙素在竹红菌的含量为 2.4 mg/g}

[参考文献]

[1] Ackroyd R, Brown N J, Davis M F, et al Aminolaevulinic acid-induced photodynamic therapy in the treatment of dysplastic barrett's oesophagus and adenocar[J]. Laser in Medical Science, 1999, 14 (4): 275-278
[2] 夏盛钦. 新型竹红菌素光敏剂的合成及其光动力性质的研究 [D]. 北京:中国科学院理化技术研究所, 2004
[3] 乐加昌, 庞素珍, 张曼华, 等. 竹红菌乙素修饰物 (—乙醇胺)对于腹水肝癌细胞光敏损伤的研究 [J]. 生物物理学报, 1994, 10 (3): 485-491.
[4] 李滨, 胡义镇, 邹伟. 竹红菌乙素与 BNAH 及 Acr - H₂的光化学反应 [J]. 中国科学 (B), 1998, 28 (3): 211-217.
[5] 赵红霞, 许以明, 张志义. 竹红菌乙素及其溴代物对 DNA 结构光敏损伤的 Raman 光谱 [J]. 科学通报, 1998, 43 (9): 955-961.
[6] Hudson J B, Imperial V, Haugland R P, et al Antiviral activities of photobactive perylenequinones[J]. Photochemistry and Photobiology, 1997, 65 (2): 352-354.
[7] Miller G G, Brown K, Ballangrud A M, et al Preclinical assessment of hypocrellin B and hypocrellin B derivatives as sensitizers for photodynamic therapy of cancer[J]. Progress Update Photochemistry and Photobiology, 1997, 65 (4): 714-722
[8] 田茂军, 饶之坤, 郭孟壁, 等. 竹红菌乙素的制备 [J]. 云南化工, 2006, 33 (3): 5-7.
[9] 顾晓天, 周家宏, 冯玉英, 等. 反相高效液相色谱法测定竹红菌中竹红菌甲素的含量 [J]. 药物分析杂志, 2006, 26 (1): 68-70.

[责任编辑: 丁 蓉]