

紫外分光光度法测定发酵菌丝中 痢囊腔菌素含量

孙 帅, 刘吉华, 周 林, 张 剑, 余伯阳

(中国药科大学中药学院, 江苏 南京 210038)

[关键词] 痢囊腔菌素 A, 发酵菌丝, 紫外分光光度法, 含量测定

[中图分类号] O657 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2010)02-0138-03

痢囊腔菌素是以 3,10-二羟基-4,9-花靛为母体的一类天然光敏剂,主要有痢囊腔菌素 A(Elsinochrome A)、痢囊腔菌素 B(Elsinochrome B)和痢囊腔菌素 C(Elsinochrome C)等,具有三重态量子产率高、单重态氧量子产率高、光毒性高和从正常组织排出速率快等优点^[1].不仅可以用来治疗一些皮肤病^[2,3],而且是潜在的新型光电转换材料^[4]和难得的研究分子内质子传递这一基本化学过程的实验材料^[5,6].近年来的研究还发现痢囊腔菌素具有杀灭 HIV 病毒^[7]、抗单纯性疱疹类型 1 病毒和 Sindbis 病毒的活性^[8].因此,该类光敏剂受到了国内外从事光敏剂研究的工作者的高度关注.

痢囊腔菌素是由痢囊腔菌属真菌产生的一类具有花靛骨架的次生代谢产物,可以通过菌种 *Elsinochrome annonae* 发酵后分离得到痢囊腔菌素 A(EA)、痢囊腔菌素 B(EB)和痢囊腔菌素 C(EC)^[8],其中痢囊腔菌素 A 是最早被发现的一种花靛类化合物^[9].但到目前为止,尚未见有关它的定量分析研究报道.为此,本文根据 EA 在 465 nm 处的特征吸收,利用紫外分光光度法对其进行直接测量,建立了痢囊腔菌素含量的测定方法,该方法具有简单、快速、准确等优点,为优化痢囊腔菌素产生菌的发酵条件和提高其产量奠定基础.

1 实验仪器与材料

1.1 仪器

十万分之一电子天平(METTLER AE240),紫外可见分光光度计(BECKMAN-DU[®] 640).

1.2 材料

Elsinochrome annonae (ATCC 15027)购于美国菌种保藏中心,EA 对照品为自制(纯度 > 98%, HPLC),其它化学试剂均为分析纯.

2 结果与讨论

2.1 对照品溶液的制备

精密称取 105℃干燥至恒重的 EA 10 mg 加入到 50 mL 容量瓶中,用丙酮配制成每毫升含 0.2 mg EA 的对照品溶液.其紫外可见吸收光谱如图 1 所示.

2.2 供试样品溶液的制备

精密称取经 60℃烘干的菌丝 100 mg 加入 10 mL 丙酮提取 4 次,将提取液转移至 50 mL 容量瓶中,用丙酮定容至刻度,摇匀即得供试样品溶液.

收稿日期: 2009-05-20

基金项目: 国家自然科学基金(20603018).

通讯联系人: 余伯阳,教授,研究方向: 生药学领域. E-mail: boyangyu@yahoo.com.cn

2.3 线性范围考察

精密吸取对照品溶液 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mL 分别置 50 mL 容量瓶中, 加丙酮稀释至刻度, 摇匀, 制成 EA 浓度分别为 4.0、8.0、12.0、16.0、20.0、24.0 mg/L 的溶液. 以丙酮做空白参比液, 于 465 nm 波长处测定吸收度, 以吸收度为纵坐标, 对照品浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 其回归方程为: $C = 64.5164 - 1.4$ ($r = 0.9996$, $n = 6$). 结果表明在所测浓度范围内浓度与吸收度呈良好线性关系.

2.4 精密度试验考察

取浓度为 8 mg/L 的 EA 标准溶液于 465 nm 处连续测定 6 次, 结果分别为: 0.1466、0.1453、0.1470、0.1449、0.1455、0.1472, 计算得 $RSD = 0.66\%$, 表明该仪器精密度良好.

2.5 稳定性试验考察

取 2.2 项下制备的供试样品溶液, 放置 0、2、4、6、8、12 h 分别在 465 nm 波长测定吸光度, 结果分别为: 0.2148、0.2139、0.2154、0.2149、0.2160、0.2157, 计算得 $RSD = 0.35\%$, 表明样品溶液在 12 h 内稳定.

2.6 重复性试验考察

精密称取经 60°C 烘干的菌丝 100 mg 6 份, 按 2.2 项制备供试样品溶液, 于 465 nm 处测定吸光度, 菌丝体中痂囊腔菌素含量及 $RSD(\%)$ 见表 1, 表中的数据表明样品溶液重复性良好.

表 1 重复性实验结果

Table 1 Result of the replicate test

	A	C (mg/g)	c (mg/g)	RSD %
1	0.1142	2.98		
2	0.1170	3.07		
3	0.1135	2.96		
4	0.1151	3.01	3.00	1.65
5	0.1129	2.94		
6	0.1160	3.04		

2.7 加样回收率试验考察

精密称取浓度已知 (2.98 mg/g) 的干菌丝体 50 mg 6 份, 每 2 份分别精密加入 EA 对照品溶液 (24 mg/L) 5.0、6.0、7.0 mL, 按供试品溶液的制备项下方法操作, 于 465 nm 处测定吸光度, 加样回收率和 $RSD(\%)$ 见表 2, 结果显示样品加样回收良好.

表 2 加样回收率实验结果

Table 2 Result of the recovery test

	加入量 / μ g	测得量 / μ g	R %	R %	RSD %
1	120	122.29	101.91		
2	120	116.16	96.80		
3	144	141.32	98.14		
4	144	149.06	103.51	99.47	2.71
5	168	163.26	97.18		
6	168	166.81	99.29		

3 结论

紫外分光光度法测定 *E. annonae* 发酵液中痂囊腔菌素的含量操作具有简便、快速、准确等优点, 可以为测定痂囊腔菌素的含量、优化其产生菌的发酵条件和提高其产量提供可靠的理论依据.

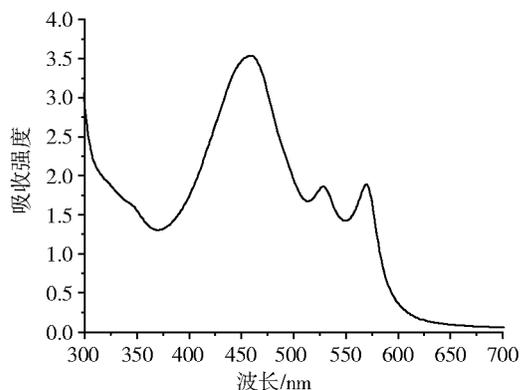


图 1 痂囊腔菌素 A 的紫外可见光谱图

Fig.1 The UV-vis absorption spectra of Elsinochrome A

[参考文献]

- [1] 张俭, 伍贤进, 罗应, 等. 痈囊腔菌素 A 对动物实体肿瘤的光动力治疗 [J]. 四川动物, 2006, 25(4): 884-885.
- [2] 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及其组织变化的研究 [J]. 中华妇产科杂志, 1984, 19(1): 29-31.
- [3] 梁睿媛, 梅国栋, 朱文英, 等. 竹红菌光化疗治疗肥厚性瘢痕 62 例报告 [J]. 中华皮肤科杂志, 1982, 15(2): 87-88.
- [4] Li L M, Zhang Z Y, Wang D H, et al. The photo-induced electron transfer between hypocrellins and colloidal semiconductors. Kinetics of photosensitized reduction in a colloidal CdS system with Hypocrellin A as a sensitizer [J]. J Photochem Photobiol A Chem, 1997, 102(3): 279-284.
- [5] Gai F, Fehr M J, Petrich J W. Role of solvent in excited-state proton transfer in hypericin [J]. J Phys Chem, 1994, 98(34): 8352-8358.
- [6] Petrich J W, Gordon M S, Gagle M. Structure and energetics of ground-state hypericin: comparison of experiment and theory [J]. J Phys Chem A, 1998, 102(9): 1647-1651.
- [7] Hudson J B, Zhou J, Chen J, et al. Hypocrellin, from *Hypocrella bambusa*, is phototoxic to human immunodeficiency virus [J]. Photochem Photobiol, 1994, 60(3): 253-255.
- [8] Blumer M, Hackeng W H L, Copier H, et al. Pigments of *Elsinoe* species [J]. Can J Microbiol, 1965, 11(1): 57-66.
- [9] Weiss U, Fahn H, Burger W C. The photodynamic pigment of some species of *Elsinoe* and *Sphaeroloma* Arch [J]. Biochem Biophys, 1957, 69(6): 311-319.

[责任编辑: 顾晓天]