

比色法测定巴西虫草菌丝体中虫草酸的含量

蔡友华^{1,2}, 范文霞^{1,2}, 刘学铭¹, 徐玉娟¹, 吴娱明¹

(1. 广东省农业科学院蚕业与农产品加工研究所, 广东省农产品加工公共实验室, 广东 广州 510610)

(2. 江西农业大学生物科学与工程学院, 江西 南昌 330045)

摘要: 利用比色法简便、准确和快速地测定了巴西虫草菌丝体中虫草酸的含量。结果表明, 虫草酸即 D-甘露醇的最大特征吸收峰在 412 nm 处, 质量浓度在 10~50 mg/L 范围内线性良好, 它的线性回归方程为: $Y=0.0102X-0.0029$, $R^2=0.9989$; 仪器精密度良好, RSD 为 0.35% (n=6); 样品显色后在 180 min 内基本没变化; 平均回收率为 100.30%, RSD 为 1.44% (n=5); 干扰试验表明在葡萄糖、鼠李糖和果糖中, 只有果糖对检测结果有较大影响。通过果糖的特征吸收峰和高效液相色谱法表明, 巴西虫草菌丝体中没有果糖的存在, 验证了比色法测定巴西虫草菌丝体中虫草酸含量的准确性; 用该方法测定的巴西虫草菌丝体中虫草酸的质量分数为 8.45%, RSD 为 0.34% (n=6)。

关键词: 比色法; 巴西虫草; 虫草酸; 甘露醇

中图分类号: TS207.3; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2008)01-0076-04

Determination of Cordycepic Acid Content in the Mycelia of *Cordyceps brasiliensis* Henn by Colorimetry

CAI You-hua^{1,2}, FAN Wen-xia^{1,2}, LIU Xue-ming¹, XU Yu-juan¹, WU Yu-ming¹

(1. The Sericulture & Farm Produce Processing Research Institute of Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangdong Open Access Laboratory of Agricultural Product Processing, Guangzhou 510610, China)(2. College of Bioscience & Bioengineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: A simple, accurate and rapid colorimetry method for the determination of the cordycepic acid content in fermented mycelia of *cordyceps brasiliensis henn* was established. The results showed that characteristic absorption peak of cordycepic acid, mannitol, was found at 412 nm. Within a linear range of 10~50 mg/L, the regression equation was: $Y=0.0102X-0.0029$, $R^2=0.9989$. The precision of the instrument was satisfactory with the RSD of 0.35% (n=6). The average recovery and RSD (n=5) were 100.30% and 1.44%, respectively. Among the tested sugar, D-fructose showed high effect on the test results. No D-fructose was found in fermented mycelia of *cordyceps brasiliensis*, which proved the colorimetric method was suitable for the determination of cordycepic acid content in fermented mycelia of *cordyceps brasiliensis henn*. The mannitol content in fermented mycelia of *brasiliensis* was found to be 8.45% with the RSD value of 0.34%.

Key words: colorimetry; *Cordyceps brasiliensis*; cordycepic acid; mannitol

虫草酸, 即 D-甘露醇, 为虫草类真菌中的主要有效成分之一, 具有利尿脱水、提高血浆渗透压、镇喘祛痰^[1]、抗自由基等药理作用, 并且对多种疾病有一定的疗效^[2]。甘露醇现已被认为是发酵虫草菌丝体中活性成分的重要测试指标之一。1988 年广东省农科院蚕业与农产品加工研究所科技人员于某自然保护区采

收稿日期: 2007-09-25

基金项目: 农业结构调整重大技术研究专项 (06-08-03B); 广东省科技攻关项目 (2005B20401020)

作者简介: 蔡友华 (1983-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 发酵工程

通讯作者: 刘学铭 (1967-), 博士, 研究员, 主要研究农产品加工及其活性成分研究

集到虫草野生菌株, 经广东微生物所鉴定为巴西虫草 (*Cordyceps brasiliensis* Henn)。之后, 方定坚等^[3]对家蚕蛹人工培养巴西虫草所产的子实体中的有效成分进行了检测, 认为人工培养巴西虫草的麦角多醇、甘露醇、腺苷、虫草多糖、氨基酸、微量元素等的含量与冬虫夏草 (*cordyceps sinensis*) 相近, 有提高实验动物免疫功能、降低血清胆固醇等药理作用。而液体培养巴西虫草所产菌丝体中虫草酸含量测定方面的研究尚未见文献报导, 本文通过研究比色法测定巴西虫草菌丝体中虫草酸的含量, 为冬虫夏草在甘露醇方面的应用找到新的替代品具有一定意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品

巴西虫草菌丝体干燥、磨粉放于样品袋中保存备用。

1.1.2 仪器

UV-visible Spectrophotometer-1700, HH-4 数显恒温水浴锅, Agilent LC1200 系列 (包括: G1379B-Degasser、G1311A Quat-pump、G1329A ALS、G1316A TCC、G1362A RIB)。

1.1.3 试剂

D-甘露醇 (分析纯), L-鼠李糖 (生化试剂), 高碘酸钾 (分析纯), 盐酸 (质量分数为 36%~38%, 分析纯), 醋酸铵 (分析纯), 冰乙酸 (化工试剂), 乙酰丙酮 (分析纯), 乙腈 (色谱纯), 果糖 (分析纯), 单蒸水。

1.2 方法

1.2.1 溶剂的配置方法

1.2.1.1 高碘酸钾溶液

15 mmol (即 3.45 g) 高碘酸钾溶于 1 L 0.12 mol/L 盐酸溶液中。

1.2.1.2 Nash 试剂

150 g 醋酸铵+2 mL 冰醋酸+2 mL 乙酰丙酮, 用蒸馏水稀释至 1 L (现用现配)。

1.2.1.3 L-鼠李糖溶液

L-鼠李糖 100 mg, 用蒸馏水定容至 100 mL。

1.2.1.4 供试品溶液的制备

精密称取虫草菌丝体粉末 4.0 g, 加蒸馏水 80 mL, 沸水浴提取 2 h 后, 过滤, 用蒸馏水洗残渣 3 次, 将滤液、洗液合并于 100 mL 容量瓶中, 加蒸馏水定容至刻度, 再从中精密取 1 mL, 置 100 mL 容量瓶中, 加蒸馏水定容至刻度作为待测样品溶液, 即浓度为 0.4 mg/mL 或者 400 mg/L (按原料计)。

1.2.1.5 标准品溶液的制备

精密称取干燥至恒重的甘露醇标准品 0.1 g 于烧杯中, 加蒸馏水 50 mL 溶解完全, 转移置 100 mL 容量瓶中定容, 配置成质量浓度为 1 g/L 的甘露醇溶液, 然后分别精密量取 1.0 mL、2.0 mL、3.0 mL、4.0 mL、5.0 mL 各置 100 mL 容量瓶中, 加蒸馏水定容至刻度, 得到质量浓度分别为 10 mg/L、20 mg/L、30 mg/L、40 mg/L、50 mg/L 的甘露醇标准溶液。

1.2.2 测定方法

精密量取待测样品溶液 1 mL, 加入 10 mL 刻度试管中, 加 1 mL 高碘酸钾溶液, 混匀, 室温反应 10 min, 加 2 mL 0.1% 的 L-鼠李糖溶液以除去过多的高碘酸钾, 振荡混匀后, 加 4 mL 新鲜配置的 Nash 试剂 53 °C 水浴 15 min 使其呈色, 之后快速冷却至室温, 用分光光度计在 412 nm 波长处, 以蒸馏水代替待测样品溶液, 用同样的方法操作作为对照, 测定其吸光度值。

1.2.3 色谱条件

色谱柱: Zorbax Carbohydrate Analysis (150 mm×4.6 mm i.d., 5 μm); 流动相: 乙腈/水 (体积比为 75/25); 流速: 1 mL/min; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μL。

2 结果与分析

2.1 样品和标准品的吸收曲线比较

分别取 1 mL 待测样品和 1 mL 50 mg/L 的甘露醇标准品, 按“1.2.2”操作分别使其呈色, 用 UV-visible Spectrophotometer-1700 紫外分光光度计使呈色的样品溶液和标准溶液分别在 200~800 nm 范围内扫描, 得到两者在该范围内的特征吸收波长图 (如图 1 所示), 两者的最大特征吸收峰基本完全重叠, 波长为 412 nm, 这与文献^[4]报道一致, 初步定性确定样品溶液中有甘露醇。

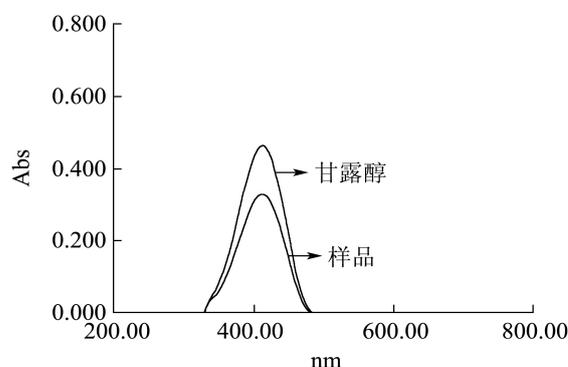


图 1 甘露醇和样品的特征吸收峰

Fig.1 Characteristic wave of mannitol and sample

2.2 甘露醇标准曲线的制备

分别精密量取 1 mL 质量浓度分别为 0 mg/L、10 mg/L、20 mg/L、30 mg/L、40 mg/L、50 mg/L 的甘露醇标准品, 按“1.2.2”操作, 结果表明, 在 10~50 mg/L 范围内, 其吸光度值与质量浓度有较好的线性关系 (如图 2 所示), 其线性回归方程为: $Y=0.0102X-0.0029$, $R=0.9989$ 。根据虫草菌粉的提取和稀释路线, 虫草菌粉中甘露醇的含量 (%) = $(X/400) \times 100$, (其中, Y 为吸光度值, X 为质量浓度)。

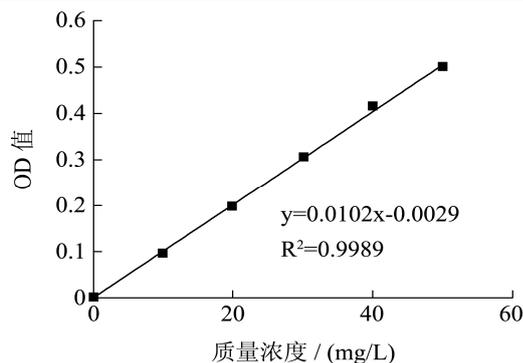


图2 甘露醇标准曲线

Fig.2 Standard curve of mannitol

2.3 精密度试验

精密量取 1ml 浓度为 0.4 mg/mL (按原料计) 的巴西虫草菌丝体提取液 6 份, 按“1.2.2”使其呈色, 在 412 nm 处测定其吸光度值, 结果分别为: 0.341, 0.346, 0.345, 0.342, 0.339, 0.337, 平均为 0.342, 相对标准偏差 RSD=0.346% (n=6)。任健敏等^[5]认为, 对于某些微量组分(仪器分析), 一般要求相对标准误差小于 8%。表明该分光光度计能够较精密地测定其吸光度值。

2.4 样品显色后稳定性试验

精密量取 1 mL 浓度为 0.4 mg/mL (按原料计) 的巴西虫草菌丝体提取液, 按“1.2.2”使其呈色, 每隔 5 min 测定其吸光度值, 连续测定了 3 h, 结果如表 1 所示。

表 1 呈色物质的稳定性
Table 1 Stability of chromogenic reagent

时间/min	平均吸光度值 A	极值 R	RSD/%
前 20	0.3476	0.0010	0.109
前 40	0.3469	0.0021	0.216
前 60	0.3465	0.0030	0.282
前 80	0.3460	0.0036	0.366
前 100	0.3456	0.0047	0.422
前 120	0.3451	0.0054	0.512
前 140	0.3446	0.0068	0.598
前 160	0.3441	0.0071	0.660
前 180	0.3437	0.0082	0.730

结果表明: 随着时间的推移, 样品在 412 nm 处的吸光度值变小, 稳定性降低。由相对标准偏差 RSD 值, 也可以明显看出, 待测样品在前 20 min 表现出比较稳定, 40 min 之后比较有规律地等差降低, 但是降低幅度很小, 由此, 可以认为样品显色后在 180 min 之内表现稳定。

2.5 干扰试验

考虑到提取液中含有葡萄糖、果糖以及剩余的鼠李糖, 将进行以下试验。精密量取 10 mL 浓度为 0.4 mg/mL (按原料计) 的巴西虫草菌丝体提取液 3 份, 分别加入这三种单糖 0.5 mg, 使其浓度达到 50 mg/L, 按“1.2.2”操作, 412 nm 处测定其吸光度值, 结果如下表。

表 2 三种单糖对甘露醇测定结果的影响

Table 2 Effect of three monosaccharides on measured value of

单糖	吸光度			平均值
	mannitol			
对照	0.341	0.339	0.343	0.341
葡萄糖	0.343	0.345	0.338	0.342
鼠李糖	0.341	0.336	0.338	0.338
果糖	1.332	1.402	1.338	1.357**

注: “**”表示在 99% 区间内显著

Note: “**”means significant in 99% compared with the CK

通过统计分析表明, 葡萄糖和鼠李糖对样品中甘露醇的测定基本没有影响 ($p>0.05$), 而加有果糖的样品与对照品相比, 则有显著影响 ($p<0.01$), 为进一步验证比色法测定巴西虫草菌丝体粉中甘露醇含量的准确性, 分别通过果糖标准品与样品的波谱比较和高效液相色谱法, 来验证样品中是否含有果糖, 结果如下图所示。

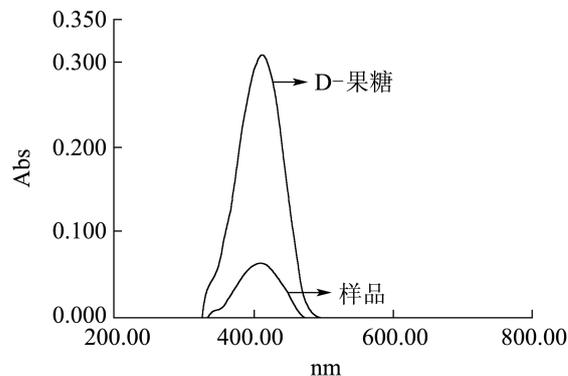


图 3 果糖标准品和样品的特征吸收峰

Fig.3 Characteristic wave of D-fructose and sample

通过果糖标准品特征吸收峰和样品特征吸收峰比较, 果糖标准品虽然在 412 nm 处也有吸收峰, 但是如图 3 所示, 其峰形宽明显比样品的要宽, 与文献^[6]报道一致, 而样品与甘露醇的峰宽是重叠的, 如图 1 所示, 初步确定样品中没有果糖, 为进一步确定, 通过 HPLC 法来鉴定样品中是否含有果糖, 如图 4 所示。

结果表明: 在相同的条件下, 果糖标准品在 5.158 min 时出峰, 而此时样品溶液则没有特征吸收峰, 表明样品中的确没有果糖的存在, 进一步证明虫草样品

通过比色法可以较准确地检测巴西虫草菌丝体中甘露醇的含量。

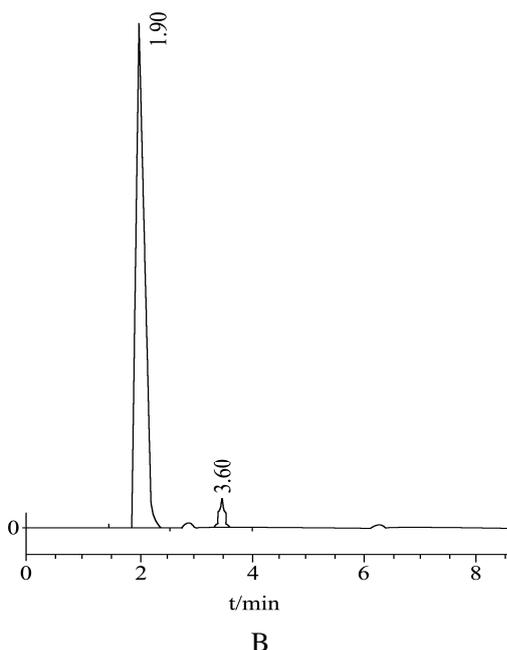
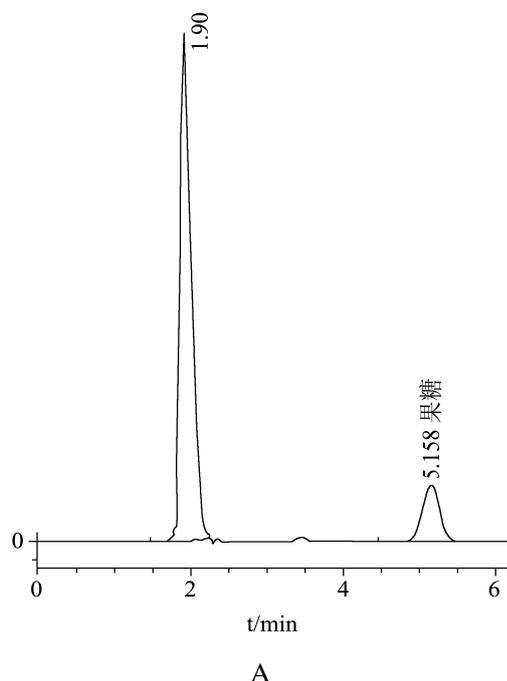


图4 果糖标准品 (A) 和样品 (B) 色谱图

Fig.4 Chromatograms of standard D-fructose (A) and sample (B)

2.6 回收率试验

取已知浓度为 33.70 mg/L 的样品溶液 5 份, 每份 2 mL, 分别加入 30 mg/L 的标准品甘露醇各 1、2、3、4、5 mL, 加水定容至 10 mL, 按“1.2.2”操作, 结果见表 3。

表 3 回收率试验结果

Table 3 The experiment result of recovery

样品量/(mg/L)	标品加入量/(mg/L)	测得量/(mg/L)	回收率/%	平均回收率/%
6.74	3	9.82	102.67	100.30
6.74	6	12.71	99.50	
6.74	9	15.76	100.22	
6.74	12	18.68	99.50	
6.74	15	21.68	99.60	

由表 3 可见: 平均回收率为 100.30%, 相对标准偏差 RSD 为 1.44% (n=5)。

2.7 巴西虫草菌丝体中甘露醇的测定结果

根据以上甘露醇的测定条件, 最终测得巴西虫草菌丝体提取液中甘露醇的含量为 8.45%, 相对标准偏差 RSD=0.34% (n=6)。

3 结论

(1) 干扰试验发现果糖的存在对巴西虫草菌粉中甘露醇的测定有较大影响, 因此在测定前要减去样品中果糖的含量。这是因为 KIO₄ 可以把具有羟基的单糖生成醛, 由于在酸性条件下游离单糖以稳定的环状结构存在, 故不会对测定结果产生干扰, 试验结果表明也吻合这个理论。但作为酮糖的果糖在相同的条件下, 不能形成稳定的环状结构, 可以被 KIO₄ 氧化^[6]。

(2) 样品在 412 nm 处的特征吸收峰跟甘露醇标准品是重叠的, 而果糖的峰则更宽。且通过高效液相色谱表明样品中没有果糖, 表明色谱法能够较准确测定巴西虫草菌丝体粉中的甘露醇含量。

(3) 利用该方法测得的人工巴西虫草菌丝体粉中甘露醇的含量为 8.45%。该方法也为其它虫草中甘露醇的测定提供了一定的参考依据。

参考文献

[1] 侯遇成. 女贞子化学成分的研究[J]. 中草药通讯, 1976, (1): 14
 [2] 孙成秀, 廖记录, 龙小慧, 等. 甘露醇的临床新用途[J]. 新医学, 1996, 27(1): 41
 [3] 方定坚, 郑祥明, 廖森泰, 等. 家蚕蛹人工培养巴西虫草研究[J]. 华南农业大学学报, 1995, 16(1): 103-108
 [4] 董钰明, 刘晖, 张军, 等. 比色法测定复方虫草颗粒中甘露醇的含量[J]. 中草药, 2001, 32(8): 697-699
 [5] 任健敏, 白玲. 定量分析化学[M]. 南昌: 江西高校出版社, 2001, 12: 11-14
 [6] 雷帮星, 高海波, 税小波, 等. 人工发酵古尼虫草甘露醇的测定[J]. 菌物研究, 2004, 2(1): 40-44