

不同来源竹黄中多糖量的分析与比较

林海萍, 殷红福, 黄小波, 毛胜凤, 刘洪波*

(浙江农林大学 亚热带森林培育省部共建国家重点实验室培育基地, 浙江 临安 311300)

摘要:目的 对不同来源竹黄中多糖的量进行分析比较, 可为竹黄的开发利用提供借鉴。方法 采用苯酚-硫酸法测定了不同生长时期、不同地点、不同寄主的 16 个竹黄样品中多糖量的变化。结果 竹黄中多糖的量与单个竹黄含多糖的量均在 5 月上中旬达到最大; 临近地点短穗竹上寄生的竹黄多糖的量以湿度较高采样点的较高; 大多数不同采样点短穗竹上寄生的竹黄中多糖的量有极显著差异, 单个子座中的竹黄多糖与竹红菌甲素的量没有显著相关性。结论 5 月上中旬是竹黄采收的最佳季节。

关键词:竹黄菌; 多糖; 竹红菌甲素

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)09-1549-04

竹黄菌 *Shiraiia bambusicola* P. Henn 是一种寄生于竹子细嫩枝杆上的子囊菌, 其子座竹黄为传统中药, 能营气卫血、破瘀止痛、恢复组织机能、增强体质。主要药理作用有镇痛、抗炎、抗菌、抗癌、护肝和保护心血管^[1]。较高的药用价值与药用潜力使竹黄在全球日益备受关注^[2]。竹黄的有效成分为竹红菌素、竹黄多糖、甘露醇、硬脂酸等^[3]。目前国内外对于竹黄的研究主要集中于竹红菌素, 而近来一些研究表明真菌多糖具有良好的抗氧化性能和清除自由基能力, 对小鼠的四氯化碳急性肝损伤具有保护作用, 具有良好的开发利用价值^[4,5], 但关于不同来源竹黄中多糖量的分析与比较的研究在国内外还未见报道。

本课题组曾研究发现竹黄菌在浙江省广泛分布, 能在短穗竹 *Brachystachyum densiflorum* (Reudle) Keng、苦竹 *Pleioblastus marus* (Keng) Keng f.、雷竹 *Phyllostachys praecox* Chu et Chao 和篌竹 *P. nidularia* Munro 4 种寄主上寄生, 并比较了不同来源竹黄中竹红菌甲素量的差异^[6]。本实验在此基础上分析比较了不同来源竹黄中多糖的量, 以期进一步为野生竹黄的开发利用提供理论指导。

1 材料

1.1 样品: 竹黄在浙江省 13 个采样点定期野外采集, 根据采集地点与寄主的不同归类, 共获得来自不同采样点或寄主的竹黄样品 16 个(表 1)。竹黄药材经浙江林学院真菌学教授张立钦鉴定。

表 1 竹黄的来源

Table 1 Sources of *S. bambusicola*

编号	采集地点	寄主	海拔/m	坡位	坡向	采集时间
Sb1	临安九仙山	短穗竹	78	下坡	阴坡	2008-04-06
Sb2	临安九仙山	苦竹	81	下坡	阴坡	2008-04-06
Sb3	临安九仙山	雷竹	76	下坡	阴坡	2008-04-06
Sb4	临安九仙山	篌竹	78	下坡	阴坡	2008-04-06
Sb5	临安青山湖	短穗竹	46	谷地	无	2008-04-06
Sb6	昌化龙井村	短穗竹	93	下坡	阴坡	2008-05
Sb7	昌化白牛乡	短穗竹	121	下坡	阴坡	2008-05
Sb8	昌化天目乡	短穗竹	136	下坡	半阴坡	2008-05
Sb9	宁波鄞县	短穗竹	58	下坡	阴坡	2008-05
Sb10	湖州梅峰镇	短穗竹	72	下坡	半阳坡	2008-05
Sb11	安吉地铺镇	短穗竹	65	下坡	阴坡	2008-05
Sb12	诸暨城关镇	短穗竹	82	谷地	无	2008-05
Sb13	丽水林场	短穗竹	113	下坡	阴坡	2008-05
Sb14	淳安辛桐镇	短穗竹	81	下坡	半阳坡	2008-05
Sb15	苍南灵溪镇	短穗竹	94	下坡	半阴坡	2008-05
Sb16	武义桃溪滩镇	短穗竹	77	谷地	无	2008-05

* 收稿日期: 2009-11-10

基金项目: 浙江省教育厅资助项目(227100027); 浙江农林大学科研启动基金(2010FR026)

作者简介: 林海萍(1973—), 女, 浙江省台州市人, 浙江农林大学森林保护省级重点学科负责人, 副教授, 博士, 从事微生物学教学与科研工作。T el: (0571) 63732760 F ax: (0571) 63740809 E-mail: zjlxyllhp@163.com

1.2 试剂: 葡萄糖标准品(批号 200808260)、苯酚、铝片、碳酸氢钠、浓硫酸、乙醇、氯仿、正丁醇均为分析纯; 考马斯亮蓝 G-250 为化学纯。

1.3 仪器: 岛津 2401PC 紫外可见分光光度计; DZF-6050 型真空干燥箱; MIKRO 22R 台式高速冷冻离心机。

2 方法与结果

2.1 竹黄样品的制备: 竹黄的采集方法为野外人工采集。在浙江省临安市选择了九仙山(短穗竹、苦竹、雷竹、箬竹)、青山湖(短穗竹)为采样点, 从 2008 年 4 月 12 日—2008 年 6 月 6 日, 每隔 5 d 野外采集样品(Sb1~ Sb5)各一次。2008 年 5 月 7 日, 采集了浙江省其他 11 个采样点的寄生在短穗竹上的竹黄样品(Sb6~ Sb16)。任取采得的同类竹黄 10 个, 洗净无菌水冲洗 3 次, 真空干燥(50 ℃、-0.1 MPa)至恒重, 粉碎后过 60 目筛, 获得竹黄粉, 备用。

2.2 标准曲线的绘制: 称取苯酚 100 g, 加铝片 0.2 g、碳酸氢钠 0.1 g, 常压蒸馏, 收集 182 ℃的馏分, 称取 2.5 g 该馏分置于棕色瓶中, 加蒸馏水 50 mL, 混匀即得质量浓度为 50 g/L 的苯酚溶液。

精密称取 105 ℃干燥至恒重的葡萄糖标准品 25.0 mg, 转入 25 mL 量瓶中, 加蒸馏水定容, 即得 1.0 mg/mL 葡萄糖标准溶液。分别精密吸取葡萄糖标准溶液 0.0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8 mL 至 10 mL 量瓶中, 定容。分别吸取 2.0 mL, 加苯酚溶液 1 mL, 摇匀, 迅速加入 5.0 mL 浓硫酸, 摇匀后放置 10 min, 再置沸水浴中加热 15 min, 取出冷却至室温, 于 490 nm 处测定吸光度(A)值。以不加标准溶液的反应体系作为空白对照。实验重复 3 次。以 A 值为横坐标, 葡萄糖质量浓度为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程为 $Y = 182.61 X + 0.0278$ ($r = 0.9990$), 结果表明葡萄糖在 0.0~80.0 $\mu\text{g/mL}$ 内与吸光度间呈良好的线性关系。

2.3 竹黄多糖提取: 精密称取干燥竹黄粉 20.0 g, 置于 100 mL 量瓶中, 加蒸馏水 40 mL, 85 ℃恒温水浴加热 2 h, 滤过, 滤渣再加蒸馏水 40 mL 按上述方法加热 2 h, 滤过, 滤液合并入量瓶, 冷却至室温后定容。量取上述滤液 5.0 mL, 加入 20 mL 无水乙醇, 4 ℃静置过夜, 4 000 r/min 离心 20 min, 弃上清液, 沉淀分别用 10 mL 无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤 2 次, 均用同样条件离心去除有机溶剂, 真空干燥(50 ℃、-0.1 MPa)得竹黄多糖粗制品。将竹黄多糖粗制品用适量蒸馏水溶解, 用氯仿-正丁醇(4:1)的 Sevage 试剂除蛋白, 其中糖液-Sevage 液(5:1), 至考马斯

亮蓝 G-250 法检测无蛋白被测出。上清液加 4 倍体积无水乙醇 4 ℃静置过夜沉淀多糖, 4 000 r/min、4 ℃离心 10 min, 沉淀分别用无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤 2 次, 均用同样条件离心去除有机溶剂, 真空干燥(50 ℃、-0.1 MPa)得精制竹黄多糖。

2.4 换算因子的测定: 由于竹黄多糖的测定与葡萄糖是有差别的, 需测定换算因子进行换算。精密称取干燥至恒重的精制竹黄多糖 25.0 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加蒸馏水溶解并定容。精密吸取 100 μL , 测定吸光度, 由回归方程求出葡萄糖的浓度, 按下式计算换算因子: $f = W(C \times D)$, 式中 W 为多糖的质量(μg), C 为多糖溶液中葡萄糖的质量浓度($\mu\text{g/mL}$), D 为多糖溶液的稀释倍数, 测得 $f = 1.68$ 。

2.5 精密度试验: 精密吸取竹黄多糖待测液 1.0 mL, 连续测定吸光度 5 次, 结果 RSD 为 0.985%。

2.6 重现性试验: 平行精密吸取 5 份竹黄多糖待测液, 每份各 1.0 mL, 测定吸光度, RSD 为 2.143%。

2.7 稳定性试验: 精密吸取竹黄多糖待测液 1.0 mL, 分别在 0、10、20、30、60 min 测定, RSD 为 0.731%。

2.8 回收率试验: 精密称取干燥至恒重的竹黄粉末 5 份, 每份为 1.0 g, 分别精密添加不同量葡萄糖标准对照溶液, 按照 2.3 的方法制备竹黄待测液, 按 2.2 方法测定吸光度, 结果得平均回收率 98.79%, RSD 为 1.624%。

2.9 不同来源竹黄中多糖量的测定: 采用苯酚-硫酸法^[7-8]测定不同来源竹黄(不同生长时期、不同地点、不同寄主)中多糖的量。将竹黄多糖粗制品转移至 50 mL 量瓶中, 加蒸馏水溶解定容, 混匀, 此溶液即为竹黄多糖待测液。精密量取上述待测液适量, 加蒸馏水至 2.0 mL, 测定吸光度, 重复 3 次。用回归方程计算待测样品溶液中葡萄糖的质量浓度, 按下式计算样品中多糖的量: 多糖量 = $(C \times D \times f / W) \times 100\%$ 。

2.9.1 不同寄主上生长的竹黄多糖量随时间的变化: 临安九仙山短穗竹、苦竹、雷竹、箬竹上寄生的竹黄(分别为 Sb1、Sb2、Sb3 和 Sb4)多糖量随时间的变化见图 1。

由图 1 可见, Sb1、Sb3 和 Sb4 竹黄多糖的量均在 5 月上旬达到最大, 而 Sb2 则在 5 月中旬达到最高。不同寄主以雷竹上寄生的竹黄多糖的量为最高(6.79%), 苦竹次之, 再是箬竹, 短穗竹最低(4.68%, 为雷竹竹黄的 68.9%)。这与竹红菌甲素的变化规律不同, Sb1、Sb3 和 Sb4 竹红菌甲素的量

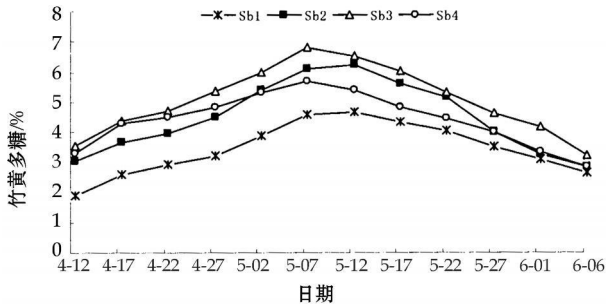


图 1 同一地点不同竹种上寄生的竹黄多糖量随时间的变化

Fig 1 Variation of polysaccharide in *S. bambusicola* stroma parasitizing at different bamboos from same place in different time

(Sb2 未测) 均在 4 月下旬达到最大, 且以篾竹上寄生的竹黄竹红菌甲素的量最高, 短穗竹次之, 雷竹最低(这与多糖的规律正好相反)^[6]。

考虑到不同寄主、不同菌龄的竹黄个体大小差异较大, 只简单地考虑竹黄多糖的量而不考虑单个竹黄含多糖的量并不全面, 尤其如果从生产、采收的角度考虑, 后者比前者更重要。因此将所得结果结合单个竹黄干质量, 得到不同寄主上寄生的单个竹黄多糖量随时间的变化规律见图 2。

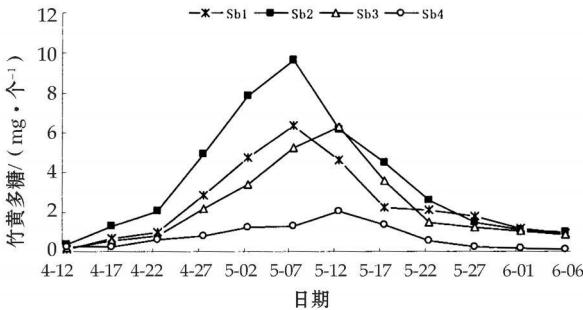


图 2 同一地点不同竹种上寄生的单个竹黄多糖量随时间的变化

Fig 2 Variation of polysaccharide in each *S. bambusicola* stroma parasitizing at different bamboos from same place in different time

从图 2 可以看出 Sb1、Sb2 单个子座多糖的量在 5 月上旬达到最高值, 而 Sb3、Sb4 均在 5 月中旬达到最高值, 此规律与竹黄多糖的量随时间变化规律基本一致。值得一提的是, Sb1、Sb3 和 Sb4 单个子座竹红菌甲素(Sb2 未测)达到最高值的时间与多糖达到最高值的时间基本一致^[6]。

与图 1 结果不同, 单个竹黄所含多糖的量以 Sb2 最高(9.67 mg/个、Sb1 与 Sb3 居中, 两者非常接近, 分别在 5 月 7 日达到 6.35 mg/个与 5 月 12 日达到 6.33 mg/个, Sb4 最低(2.03 mg/个, 仅为 Sb2 的

21.0%), 可见不同竹种单个竹黄所含多糖的量差异更明显。这是因为 Sb1 与 Sb2, 特别是 Sb2 子座较大, Sb3 居中, 而 Sb4 较小。

如从生产上考虑, 应该认为 5 月上中旬是采集竹黄的最好时期, 这时候竹黄个大, 含竹黄多糖与竹红菌甲素均最高。

2.9.2 同种寄主上竹黄多糖的量随时间的变化: 临安九仙山短穗竹与青山湖短穗竹上寄生的竹黄(分别为 Sb1 与 Sb5)的多糖量随时间的变化规律见图 3。

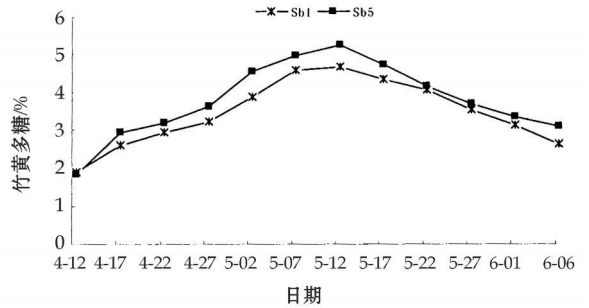


图 3 临近地点短穗竹上寄生竹黄多糖量随时间的变化

Fig. 3 Content variation of polysaccharide in *S. bambusicola* stroma parasitizing at *B. densiflorum* from near spot in different time

由图 3 可见, 邻近地点、同一寄主上竹黄多糖的量随时间的变化趋势基本相同, 均在 5 月中旬达到最高值, 而绝对值以青山湖的竹黄较高, 其最高值为九仙山竹黄的 1.13 倍。这可能是因为多糖的量受小环境的影响, 青山湖环境相对湿度较大, 有利于多糖的形成。

将图 3 的结果结合单个竹黄质量, 得到邻近地点短穗竹上单个竹黄含多糖随时间的变化曲线, 见图 4。

由图 4 可见, Sb5 单个子座多糖的量最高值明显比 Sb1 的高(1.35 倍), 比竹黄多糖的量的差异明

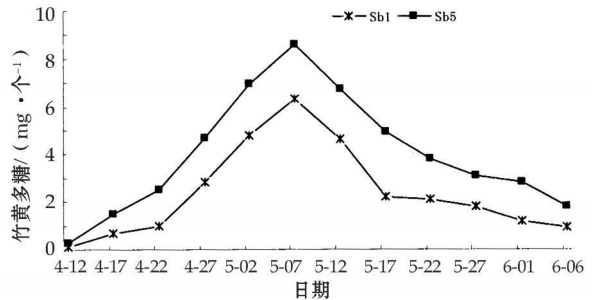


图 4 临近地点短穗竹上单个竹黄多糖量随时间变化曲线

Fig. 4 Variation of polysaccharide in *S. bambusicola* stroma parasitizing at *B. densiflorum* from near spot in different time

显,主要是因为 Sb5 子座普遍比 Sb1 的大。这可能是由于青山湖湿润的环境不但有利于多糖合成,也有利于竹黄菌的生长,形成较大子座。

2.9.3 不同采样点短穗竹上单个竹黄多糖的量比较:不同采样点短穗竹上生长的单个竹黄多糖与竹红菌甲素的量见表 2。

表 2 不同采样点短穗竹上单个竹黄多糖与竹红菌甲素的量($x \pm s, n=3$)

Table 2 Content of polysaccharide and hypocrellin A in each *S bambusicola* stroma parasitizing at *B densiflorum* from different sampling areas ($x \pm s, n=3$)

编号	多糖/(mg·个 ⁻¹)	竹红菌甲素/(μg·个 ⁻¹)
Sb1	6.35±0.14 Jj*	10.62±0.16 Ce
Sb5	8.59±0.16 Ee	9.23±0.21 Ee
Sb6	9.21±0.19 Cc	8.40±0.18 Ff
Sb7	8.42±0.20 Ff	9.23±0.25 Ee
Sb8	7.96±0.11 Hh	10.30±0.13 Dd
Sb9	6.89±0.14 Ii	2.62±0.05 Ll
Sb10	4.50±0.05 Kk	6.47±0.10 Ii
Sb11	7.88±0.12 Hh	6.77±0.13 Hh
Sb12	6.92±0.08 Ii	5.31±0.10 Jj
Sb13	9.07±0.09 Dd	3.22±0.07 Kk
Sb14	8.16±0.18 Gg	16.60±0.29 Aa
Sb15	12.43±0.21 Aa	7.48±0.17 Gg
Sb16	10.25±0.23 Bb	11.22±0.24 Bb

* 不同大写字母标注的数字表示在 0.01 水平差异极显著,不同小写字母标注的数字表示在 0.05 水平差异显著

* Data marked with different capital letters mean very significant difference at 0.01 level, data marked with different small letters mean significant difference at 0.05 level

由表 2 可见,除个别差异性不显著外,大多数不同采样点短穗竹上寄生的竹黄在同一时期不论是多糖还是竹红菌甲素的量均存在极显著的差异,可见

竹黄中这 2 种主要有效成分的量受环境的影响较大。那么不同采样点短穗竹上单个竹黄多糖与竹红菌甲素的量之间是否存在相关性,分析结果表明相关性系数 $R=0.143<R_{0.01}=0.641$,可见两者之间的相关性不显著,可能是因为多糖与竹红菌甲素的合成途径不同。

3 讨论

经查阅国内外文献,未见有关竹黄菌子座多糖量的报道。本实验分析比较了不同来源竹黄的多糖量,并进行了差异性与相关性分析,不但初步揭示了竹黄多糖的变化规律,而且为中药材竹黄的开发利用提供了一定的理论依据与指导。

在竹黄多糖的测定中,多糖的提取工艺与测定方法对结果的准确性至关重要,而对于竹黄多糖的提取与分析,很少有现成的文献可供参考,本实验经过试验摸索,筛选出了以上的工艺与方法,经验证其精密度、重现性、稳定性、回收率等均较理想,证明试验方法稳定可行。

参考文献:

[1] 林海萍,黄小波,毛胜凤,等.野生竹黄菌生物学性状研究[J].中草药,2008,39(9):1407-1409
[2] Cheng T F, Jia X M, Ma X H, et al. Phylogenetic study on *Shiraia bambusicola* by rDNA sequence analyses [J]. *J Basic Microbiol*, 2004, 44(5): 339-350
[3] 李 聪,谢金伦,陈远腾.肉座菌科三种药用真菌的化学成分分析比较[J].中草药,2000,31(4):260-261
[4] 陈佳佳,扶教龙,顾华杰,等.竹黄多糖 BSP-1 的组成和抗氧化活性分析[J].食品研究与开发,2008,29(8):120-123
[5] 陈佳佳,扶教龙,胡翠英,等.竹黄多糖的提取工艺及清除自由基活性研究[J].江苏农业科学,2008(2):196-198
[6] 林海萍,吴美芳,季伟强.不同来源竹黄中竹红菌甲素比较研究[J].中草药,2005,36(增刊):251-254
[7] 刘桂萍.冬虫夏草多糖测定方法的研究进展[J].药学实践杂志,2008,26(1):53-54
[8] 高丽娟.黑木耳中多糖的测定[J].中国医药工业杂志,2003,34(3):144-145

促进剂组合对中国红豆杉细胞悬浮培养紫杉醇合成的影响

李千雄^{1,2},张京维^{1,2},骆雪兰^{1,2},侯云屏^{1,2},黄巧明^{1,2*}

(1 梅州市杉维生物医药工程研究有限公司,广东 梅州 514031; 2 紫杉醇产业工程技术研究开发中心,广东 梅州 514031)

摘要:目的 研究中国红豆杉 *Taxus chinensis* 细胞悬浮培养中蔗糖、柠檬酸三铵、水杨酸和氨基酸前体组合对细胞生长和紫杉醇(taxol)积累的影响。方法 采用 $L_9(3^4)$ 设计试验,考察了第 9 天添加蔗糖(10、16、22 g/L)、柠檬酸三铵(0、154、1 540 mg/L),第 21 天添加蔗糖(20、26、0 g/L)和不同时间组合添加水杨酸及氨基酸前体 4 个因素对红豆杉细胞悬浮培养和紫杉醇合成的影响。结果 当在细胞培养的第 0 天添加 1.67 mg/L 硝酸银,第 9 天添加 10 g/L 蔗糖,第 9 天添加 1 540 mg/L 柠檬酸三铵,紫杉醇达到最高,在此最优组合处理时紫杉醇质量浓度达到 39.2 mg/L,相对于最差组合处理的(2.1 mg/L)时提高 18.7 倍。结论 促进剂组合对中国红豆杉细胞悬浮培养的生长和紫杉醇的合成都有很明显的影

* 收稿日期:2009-11-04
基金项目:中小企业创新基金(国防科发计字[2008]434 号);山区及东西两翼技术创新项目(2007915226)
作者简介:李千雄(1972—),男,广东省五华人,1994 年毕业于四川大学大学生物工程微生物专业,生物技术工程师,主要从事红豆杉植物细胞大量培养生产紫杉醇的研究。Tel: (0753) 2183210 Fax: (0753) 2183269 E-mail: ganxiongli@hotmail.com