

紫芝中三萜化合物标准化提取方法研究

张宪民, 乔 英, 邱明华*

中国科学院昆明植物研究所植物化学 西部植物资源持续利用国家重点实验室, 昆明 650204

摘要:为了更好地发挥紫芝的药用功效, 本文优选了紫芝子实体三萜类化合物的提取条件。采用 $L_9(3^4)$ 正交实验设计, 以提取溶媒、提取方法、提取时间和提取次数四因素三水平的提取工艺优选。各因素重要性依次为提取溶媒 > 提取次数 > 提取方法 > 提取时间。本文确定了以氯仿或丙酮为提取溶剂提取紫芝中三萜类物质的标准化方法。在提取过程中如果采用甲醇、乙醇或水作为提取溶媒, 虽然提取效率高, 但含糖、氨基酸等其它非三萜成分多, 三萜类物质提取不全。

关键词: 紫芝; 三萜; $L_9(3^4)$ 正交提取试验

中图分类号: R931.71; Q946

文献标识码: A

Optimized Preparation Method of Triterpenoids from *Ganoderma sinense*

ZHANG Xian-min, QIAO Ying, QIU Ming-hua*

State Key Laboratory Phytochemistry and Plant Resource in West China, Kunming Institute of Botany,
the Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China

Abstract: The optimal preparation conditions of extracting triterpenoids of the fruiting bodies *Ganoderma sinense* were studied by $L_9(3^4)$ orthogonal experiments with respect to solvents, time, methods and duration. The order in decreasing importance of these four factors is consistency > times > method > duration. The results indicated that extraction of triterpenoids from *Ganoderma sinense* using chloroform and acetone was optimal. If methanol, ethanol and water were used as solvent in extraction process, compounds with strong polarity such as saccharides and amino acids would be the major extracted matter. However, triterpenoids in *Ganoderma sinense* are extracted incompletely even though the extraction efficiency is high.

Key words: *Ganoderma sinense*; triterpenoids; $L_9(3^4)$ orthogonal extraction experimentation

紫芝 (*Ganoderma sinense* J. D. Zhao et al.)^[1] 系真菌门层菌纲非菌目灵芝菌科灵芝属真菌, 俗称灵芝草, 仙草。灵芝属类真菌具有 3 种生长形式: 菌丝体、子实体和孢子。通常所称灵芝是指灵芝属真菌赤芝的子实体部分。灵芝在我国已有二千余年的药用历史, 始载于《神农本草经》, 用其子实体, 被列为上药。该书指出灵芝“主胸中结, 盖心气, 补中, 增智慧, 不忘”, “久服轻身, 不老, 延年, 神仙”。古代医药学家通过临床实践认识到灵芝具有“扶正固本”作用, 能“补五脏之气”, 可用于防治多种疾病, 具有较高的药用及保健用途。近年来的研究表明它

具有多方面的生物活性: 抗肿瘤^[2,3], 降血压^[4], 免疫调节^[5], 抗病毒, 抗 HIV-1^[6], 降血糖, 抗过敏等等。中国药典 2000 年版规定赤芝与紫芝为药用正品。且用比色法测定灵芝多糖(以无水葡萄糖计), 含量不少于 0.50% 为合格品。

紫芝含多种化学成分如: 多糖, 寡糖, 氨基酸, 生物碱, 核苷, 甾醇, 有机酸, 多肽以及三萜等。三萜类化合物是灵芝的主要化学成分之一, 灵芝中的很多三萜类化合物具有生理活性, 有保肝排毒^[7]、抗氧化^[8]、抗菌消炎^[8]、抗 HIV-1 等作用^[6]。灵芝三萜化合物提取物, 也有不少研究, 但对三萜化合物提取方法, 尚无标准化提取方法, 是提取物的质量控制难以实现, 生物活性的研究结果, 也就变为难以肯定。因而我们设计了常规的三水平四因素正交试验, 进行了紫芝三萜化合物的标准化提取方法研究, 本文报告这一实验结果。

收稿日期: 2006-03-10 接受日期: 2006-04-28

基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向(KSCZX-SW-301-08); 西部之光联合学者计划

* 通讯作者 Tel: 86-871-5223327; E-mail: mhchiu@mail.kib.ac.cn

本研究组对紫芝子实体三萜类化合物的研究结果表明:紫芝中含有极性较小的非酸性三萜类化合物,如 ganodermatriol、ganodermanontriol、ganoderiol A、polycarpol 等较多。三萜酸类化合物如灵芝酸 A(ganoderic acid A)、赤芝孢子酸 A(ganosporeric acid A)、赤芝酸 A(luidenic acid A)、灵芝酸 B(ganoderic acid B)、灵芝酸 C(ganoderic acid C)等物质较少。

为了更好地发挥紫芝提取物的药用功效,我们试图找出紫芝中三萜化合物提取方法。分别以提取率和灵芝醇 A(ganoderiol A)(1)为检测指标,测定紫芝中低极性三萜的总量及指标物灵芝醇 A(Ganoderiol A)(1)的含量。本试验采用常规的三水平四因素正交设计法,以提取溶媒、提取方法、提取时间、提取次数四因素三水平的进行提取工艺优选。

1 仪器和材料

1.1 实验材料

紫芝(*G. sinense* J. D. Zhao *et al*),购自昆明药材市场;由昆明植物研究所杨祝良研究员鉴定。

表 1 正交实验设计因素

Table 1 Factors and levels of orthogonal design

编号 No.	溶媒 Solvent	提取方法 Method	提取时间 Extract time (h)	提取次数 Extract times
1	水 Water	室温提取 Room temperature extraction	1	1
2	乙(甲)醇 Methanol /ethanol	室温超声 Room temperature ultrasonic extraction	2	2
3	氯仿 Chloroform	加热回流 Heat up reflux	3	3

注:室温超声提取方法为室温浸泡时间 2/3,超声时间 1/3。

1.2 仪器

HPLC 仪器为惠普 1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);色谱柱:ZORBAX SB-C18,4.6 X 150

mm,5 u;流动相:甲醇-水(70% ~ 100% 20 min; 100% 10 min)梯度洗脱;流速:0.5 mL/min;检测波长 UV:250 nm;柱温:30 ℃。

2 实验方法与结果

提取条件优选,溶剂加入量均为浸过样品。实际用量为:第一次为 10 g/150 mL;第二、三次均为 10 g/120 mL。

由于经验已知室温下提取得率通常较低,将室温提取时间放大一倍。

精密称取紫芝子实体粗粉 2.0 g 左右,共 54 份,按正交设计方案,进行 $L_9(3^4)$ 正交实验。有机溶剂提取液,于 55 ℃ 水浴上减压浓缩至干,真空干燥(0.1 MPa)5 h 后,称重,计算提取率。水提取物真空干燥 50 h 以上,称重,计算提取率。提取物精密度和重复性试验:每一样本,重复提取操作六次,计算其平均含量(提取率)提取实验结果。

表 2 提取实验结果

Table 2 Results of extracting experiment

得率 Yield 实验号 No.							平均值 Average
	1	2	3	4	5	6	
1	3.31	3.10	3.28	2.99	3.47	2.95	3.18
2	3.65	3.19	3.41	3.58	3.53	3.59	3.49
3	6.27	6.42	6.29	5.94	6.50	6.37	6.30
4	5.21	5.25	5.18	4.67	5.28	4.85	5.07
5	5.22	5.31	5.38	4.76	4.69	4.72	5.01
6	5.53	5.23	5.98	5.17	5.85	5.02	5.46
7	1.95	2.06	2.27	1.97	2.31	2.41	2.16
8	3.95	3.81	3.75	3.38	3.84	3.34	3.68
9	2.19	1.81	2.17	1.91	1.88	2.21	2.03

将 6 次提取样本合并,取其平均值,获得待测样品,每一样本测定 6 次,考察其准确性和精密度。取其平均值,作为正交试验数据。

表 3 正交实验设计数据

Table 3 Data of orthogonal design

实验号 No.	提取溶媒 Solvent	提取方法 Method	提取时间 Time (h)	提取次数 Times	实验结果 Result (%)
1	纯水 Water	室温浸泡 Room temperature marinate	2	1	3.18
2	纯水 Water	室温超声 Room temperature ultrasonic extraction	4	2	3.41
3	纯水 Water	加热回流 Heat up reflux	3	3	6.30
4	甲醇 Methanol	室温浸泡 Room temperature marinate	4	3	5.07
5	甲醇 Methanol	室温超声 Room temperature ultrasonic extraction	6	1	5.01
6	甲醇 Methanol	加热回流 Heat up reflux	1	2	5.46

7	氯仿 Chloroform	室温浸泡 Room temperature marinate	6	2	2.16
8	氯仿 Chloroform	室温超声 Room temperature ultrasonic extraction	2	3	3.68
9	氯仿 Chloroform	加热回流 Heat up reflux	2	1	2.03
Average 1	4.317	3.470	4.107	3.407	
Average 2	5.180	4.053	3.523	3.697	
Average 3	2.623	4.597	4.490	5.017	
极差 R	2.557	1.127	0.967	1.610	

极差 R 值数据表明:各因素重要性依次为提取溶媒 > 提取次数 > 提取方法 > 提取时间。

正交实验数据证明:若以紫芝子实体提取物得率计算,则甲醇加热提取 3 次,每次 3 h 为最佳提取方法。

以 85% 乙醇加热回流提取与纯甲醇加热回流提取之平行实验表明,85% 乙醇提取物得率较高(条件:加热回流 1 h,提取 2 次。甲醇提取物得率为 5.46%;85% 乙醇提取物为 5.51%)。但无明显区别。工业化提取建议采用乙醇为提取溶媒。

以氯仿加热回流 2 h,提取 1 次与丙酮加热回流 2 h,提取 1 次之平行实验表明,氯仿提取物与丙酮提取物的得率基本相同(氯仿:得率:2.03%;丙酮:得率:2.05%)。

以甲醇加热回流 1 h,提取 2 次与丙酮加热回流 1 h,提取 2 次之平行实验表明,甲醇提取物与丙酮提取物的得率差别较大(甲醇:得率:5.46%;丙酮:得率:2.95%)

鉴于上述提取方法优选实验结果,精密称取紫芝粉末 2.0 g,各自取甲醇,丙酮,氯仿加热回流提取 3 次,回收溶剂后得到甲醇提取物(6.27%),丙酮提取物(6.04%)和氯仿提取物(6.01%)三个待测样本。

鉴于上述提取方法优选实验结果,精密称取紫芝子实体粉末 2.0 g,各自取甲醇,丙酮,氯仿加热回流提取 3 次,回收溶剂后得到甲醇提取物(6.27%),丙酮提取物(6.04%)和氯仿提取物(6.01%)三个待测样本。

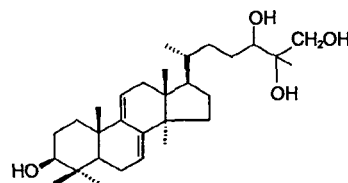


图 1 Ganoderiol A 的结构

Fig. 1 Structure of Ganoderiol A

每一编号样本 HPLC 测定 6 个样品,取其测定值平均结果。供试品溶液的配制:取上述各提取物,加四氢呋喃少许溶解后,定容于 2 mL 容量瓶中,制成 1 g/mL 生药的紫芝提取物。对照品溶液配制:精密称取 20 mg 灵芝醇 A(Ganoderiol A),加四氢呋喃少许溶解后,加甲醇定容于 10 mL 容量瓶中,为 HPLC 标准品溶液。参考常见 HPLC 文献,取 1、2、3、4、5 μ L 测定。实验表明其实验数据呈线性。范围:0.2 ~ 1.0 μ g。HPLC 分析结果如下。

表 4 HPLC 分析数据

Table 4 Data of HPLC analysis

提取方法 Method	含量 Content						平均值(%) Average
	1	2	3	4	5	6	
甲醇提取 Methanol	0.04822	0.04824	0.04831	0.04799	0.04849	0.04802	0.04821
丙酮提取 Acetone	0.04855	0.04841	0.04809	0.04849	0.04811	0.04833	0.04833
氯仿提取 Chloroform	0.04818	0.04855	0.04812	0.04849	0.04839	0.04838	0.04835

纯水提取物颜色较浅,而有机溶剂提取物颜色较深。HPLC 实验表明,灵芝纯水提取物中含低极性三萜类物质很少,却含有较多的酸性三萜类物质。以上述色谱条件检测紫芝子实体纯水提取物时,可以认为该提取物几乎不含此类低极性三萜类物质。

3 结果与讨论

该紫芝子实体中含有较多的非酸性三萜,其色谱分离方法之灵敏度较高,而分离条件较为简单;而前人重点研究灵芝三萜酸类,采用的色谱分离条件较复杂,特别是紫芝中含有较多的胶质与三萜酸类

化合物相互结合,对三萜酸的分离效果有较大的干扰。提取过程中采用甲醇,乙醇或水作为提取溶媒时,提取物中含有糖、氨基酸等大极性成分,提取率较高,但是三萜类物质反而相对较少。作为三萜化合物的标准提取方法,建议以氯仿或丙酮为提取溶剂,得到富含三萜化合物的标准化提取物。本实验研究表明,该提取方法,三萜较为稳定,提取得率重复性好。

参考文献

- 1 Lin ZB(林志彬). Contemporary Studies on *Ganoderma lucidum*(灵芝的现代研究). Beijing: Peking Union Medical College and Beijing Medical University United Press, 2001.
- 2 Cao QZ, Lin ZB. Antitumor and anti-angiogenic activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharides peptide. *Acta Pharm Sin*(药学学报,英文版), 2004, 25: 833-838.
- 3 Huang SM(黄书铭), Zhao HQ(赵虹桥), Shi LM(施量毛). Comparative study of polysaccharide contents in *Parthenocissus*. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2006, 16: 146-148.
- 4 Zhang WM(张卫明), Sun XM(孙晓明), Wu SL(吴素玲), et al. Studies on the regulation of the blood fat function of *Ganoderma lucidum* spores powder. *Chin Wild Plant Resources*(中国野生植物资源), 2001, 20: 14-16.
- 5 Li PZ(李平作), Zhang KC(章克昌). Studies on pH controlled fermentation of bioactive exopolysaccharides by *Ganoderma lucidum*. *Microbiology*(微生物学通报), 2000, 27: 5-8.
- 6 Min BS, Nakamura N, Miyashio H, et al. Triterpenes from the spores of *Ganoderma lucidum* and their inhibitory activity against HIV-1 protease. *Chem Pharm Bull*, 1998, 46: 1607-1612.
- 7 Wang MY(王明宇), Liu Q(刘强), Che QM(车庆明), et al. Effects of triterpenoids from (*Leyss. Ex Fr.*) Karst on three different experimental liver injury models in mice. *Acta Pharmaceutica Sinica*(药学学报), 2000, 35: 326-329.
- 8 Lin L(蔺丽), Fang NH(方能虎), Wu D(吴旦). A survey on effective constituents of *Ganoderma lucidum*. *Chin Tradit Pat Med*(中成药), 2002, 24: 793-796.