

灵芝体外抗肿瘤成分的提取与分离[△]

北京理工大学材料科学研究中心(100081)
中国无锡三联高科技开发公司

杨新林 赵东旭 王利波 朱鹤孙
徐建兰

灵芝作为一种重要的传统滋补中药,现代医学对其有效化学成分的分析、药理及临床应用研究已取得较大进展^[1-3]。动物实验表明,灵芝多糖可明显提高机体免疫功能,从而抑制 S-180 肉瘤、Lewis 肺癌和结肠癌等多种肿瘤生长^[4-5]。最近,我们发现灵芝孢子醇提物能够抑制体外培养的人子宫癌 HeLa 细胞的生长^[6],灵芝子实体醇提物亦有相似的作用(待发表资料),表明灵芝中含有体外抗肿瘤成分。笔者报道这些抗肿瘤成分的提取及初步分离。

1 材料与与方法

1.1 材料:灵芝子实体由北京同仁堂饮片厂生产,干燥捣碎成粉。破壁灵芝孢子粉由中国无锡三联高科技开发公司提供。用乙醇提取 3 次,减压浓缩成浸膏备用。

1.2 不同溶剂的提取效果:取灵芝子实体粉和破壁孢子粉各 2 份,分别用乙醇和氯仿浸泡提取,减压蒸干后都用乙醇溶解,然后进行细胞毒性检测。

1.3 温度影响:取子实体浸膏分成两组。一组用纯乙醇溶解,另一组用 50%乙醇水溶液溶解并离心去除沉淀。分别置于 70℃~100℃保温 1 h 后,减压蒸干,用乙醇溶解,进行细胞毒性检测。

1.4 活性成分的初步分离:子实体浸膏分成 4 组,3 组分别用二甲亚砜、石油醚和氯仿溶提,所得溶解与不溶部分都用乙醇再次溶解。第 4 组先用氯仿溶提,溶解部分再用饱和 NaHCO₃ 萃取 4 次,萃取液于 0℃用 6 mol/L HCl 调至 pH 3~4,得沉淀;用时收集氯仿层蒸干,两者再溶于乙醇。以上各液进行细胞毒性检测。

1.5 硅胶柱层析分析:经过上述初步分离的样品采用柱层析进一步分离。以 GF₂₅₄型硅胶(山东省烟台市化学工业研究所生产)作柱填料,氯仿-甲醇为洗脱系统。氯仿-甲醇的洗脱比例为 100:0、98:2、95:5、80:20 以及 0:100,各为 300 mL,每 100 mL 收集 1 份。各收集部分经减压蒸干后分别用乙醇溶解,然后进行活性检测。

1.6 体外抗肿瘤活性检测:各种提取液的体外抗肿瘤活性检测方法参考作者以前论文^[6]。指数生长期的 HeLa 细胞用含 15%小牛血清的 DMEM 培养基(SIGMA)接种于 96 孔培养板上,每孔约 10⁵ 个细胞,24 h 后换用含提取液的无血清培养基继续培养,以乙醇为对照。每隔 24 h 在倒置显微镜下观察细胞生长状况,连续观察 72 h。以各液对 HeLa 细胞的毒害程度作为衡量其体外抗肿瘤活性大小的指标。

2 结果与讨论

2.1 不同溶剂对灵芝子实体及孢子中体外抗肿瘤活性的提取效果:乙醇和氯仿是提取中草药有效成分时常用的 2 种不同极性的有机溶剂。我们比较了它们用于提取灵芝中体外抗肿瘤活性的效果。结果表明,无论是灵芝子实体还是孢子,其乙醇溶提液中的活性均高于氯仿溶提液。同时,孢子醇提液的活性高于子实体。

2.2 温度对灵芝体外抗肿瘤活性的影响:实验中减压浓缩采用的温度一般为 40℃~50℃。为了确定体外抗肿瘤活性成分在该温度以上的稳定性,我们检测了 70℃~100℃对活性的影响。由于乙醇的沸点低于 80℃,我们将灵芝子实体乙醇浸膏分别溶于纯乙醇和 50%乙醇水溶液,二者分别保温至 80℃和 100℃。结果表明,在该温度范围内,活性并未损失,表明对温度非常稳定。

2.3 灵芝子实体醇提液的初步分离:灵芝子实体乙醇浸膏分别用石油醚和氯仿溶提,活性成分存在于石油醚的不溶部分和氯仿可溶部分。后者又经饱和 NaHCO₃ 萃取,萃取液(主要含有灵芝酸 A、B 等酸性杂质^[8])活性极低,活性成分存在萃取后的残液中。

2.4 灵芝中抗肿瘤成分的硅胶柱层析分析:先用氯仿与甲醇进行两步洗脱,发现氯仿洗脱下来的组分不具有活性,甲醇洗脱组分中含有高的活性。在此基础上,用不同浓度比的氯仿-甲醇洗脱并分步收集,

(下转第 513 页)

[△]国家科委生命科学技术发展中心主任基金项目

的甲醇液。

2.5 薄层层析:吸取供试液、药材对照液、阴性对照液、标准对照液各 2 μ L,分别点于同一含羧甲基纤维素钠为粘合剂的硅胶 G 板上,以氯仿-甲醇-氨水(20:5:0.5)展开,取出晾干,以 0.1%茚三酮乙醇液为显色剂,显色约 5 min,结果样品供试液、药材对照液、标准对照液在相应的位置上有紫红色的斑点,阴性液则无。

3 含量测定

3.1 扫描条件^[2~5]:将显色后的层析板置扫描仪中,测定斑点的吸收光谱,结果测得 $\lambda_{max}=520$ nm, $\lambda_{min}=650$ nm,实验采用 $\lambda_s=520$ nm, $\lambda_R=650$ nm, $S_x=3$,采用双波长锯齿扫描。

3.2 标准曲线的绘制:分别准确吸取盐酸麻黄碱标准品 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 μ L 各 3 点,点于同一薄层板上,按选定的色谱条件展开显色后,分别测各斑点的峰面积积分值,以浓度为横坐标,峰面积积分值为纵坐标,绘制标准曲线,结果表明,盐酸麻黄碱在 1.16~4.6 μ g 范围内呈线性关系,对所得数据进行回归分析,得回归方程 $Y=18149.05+13761.38X$, $r=0.9962$ 。

3.3 稳定性试验:将层析显色后的薄层板放冷后,测定峰面积积分值,比较稳定,峰面积积分值基本不变($RSD=2.0\%$)。

3.4 精密度考察:在同一薄层板上点 10 个 3 μ L 的

对照品溶液,展开,测定,结果表明: $RSD=1.7\%$,重现性较好。

3.5 样品测定:精密称取样品约 6 g,按制备方法制备供试液,用定量毛细管分别吸取供试液 2 μ L,标准对照液 1、3 μ L 点于同一薄层板上,按“标准曲线项”下展开显色后测定,用外标两点法计算样品麻黄碱的含量,见表 1。

表 1 样品中麻黄碱含量

| 批号 | 取样量 (g) | 含量 (mg/g) | 平均含量 (mg/g) | RSD(%) |
|--------|------------|--------------|----------------|--------|
| 970401 | 6.1378 | 1.529 | | |
| 970402 | 6.2406 | 1.502 | 1.511 | 3.57 |
| 970403 | 6.2618 | 1.492 | | |
| 970404 | 6.1809 | 1.521 | | |

3.6 回收率试验:取已知含量的样品共 4 份,分别加入一定量标准品,按供试液项下制备方法制备供试液,然后分别准确吸取供试液点于同一薄层板上,按“样品测定”项下方法测定麻黄碱的含量并计算回收率,平均回收率 95.9%, $RSD=1.51\%$ 。

参考文献

- 1 中华人民共和国药典.一部.1995:285
- 2 王维彬,等.中草药,1992,23(5):245
- 3 王福利,等.中草药,1993,24(6):303
- 4 程怡,等.中成药,1990,12(6):15
- 5 贾元印,等.中草药,1990,21(1):19

(1999-02-01 收稿)

(上接第 494 页)

结果表明,在本实验采用的硅胶柱层析及洗脱系统中,活性成分集中在氯仿-甲醇比为 98:2~80:20 部分,而且成分不止一种,极性有强弱之分。目前正在将各活性组分进一步纯化,得到纯化合物进行结构测定与分析,为相关抗肿瘤药物的分子设计提供有用的参考。

参考文献

- 1 章灵华,等.西北药学杂志,1993,8(1):31
- 2 韩玉复,等.中药材,1995,18(5):266
- 3 王芳生,等.药学报,1996,31(3):200
- 4 Sone Y, et al. Agric Bio Chem,1985,49(9):2641
- 5 闵三弟,等.食用菌学报,1996,3(1):21
- 6 Yang Xinlin, et al. J Beijing Institute of Technology, 1997,6(4):336
- 7 Kubota T, et al. Helv Chim Acta, 1982,65(2):611

(1998-08-20 收稿)

清华科技函授学院中医专业招生

为继承和发展祖国医学,培养具有专业技能的中医人才,本校继续面向全国招生。选用 12 门全国统编中西医函授教材,与当前全国高等教育自考相配合,聘请专家教授进行教学,全面辅导和答疑。愿本校能成为您医学道路上的良师益友。凡具中学程度者均可报名,详见简章。附邮 5 元至合肥市望江西路 6-008 信箱中函处即寄。邮编:230022。电话:0551-3644909