

# 灵芝深层发酵产物中四环三萜酸性分析

无锡轻工大学生物工程学院(214036) 李平作\* 夏结红 章克昌

**摘要** 以甲苯-乙酸乙酯-乙酸(12:4:0.5)为展开剂,以硫酸-甲醇(1:1)为显色剂,通过硅胶薄层层析法由灵芝发酵产物中分离得到3种四环三萜酸,命名为M<sub>1</sub>、M<sub>2</sub>和M<sub>3</sub>,其R<sub>f</sub>值分别为0.56,0.49,0.17。并对这3种物质的紫外光谱特性进行了研究。抗菌实验显示3种四环三萜酸具有抑制大肠杆菌、产气杆菌、肠炎杆菌、金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌生长的活性。

**关键词** 灵芝 四环三萜酸 紫外光谱 抑菌实验

灵芝中四环三萜类化合物是近年来发现的灵芝中另外一类具有明显药理活性的化合物。在化学结构上属于四环三萜类化合物,具有护肝和排毒<sup>[1]</sup>、降血压<sup>[2]</sup>、降胆固醇<sup>[3]</sup>等作用。灵芝中四环三萜首先由Kubota<sup>[4]</sup>等从灵芝*G. lucidum*的子实体中得到;此后Nishitoba<sup>[5]</sup>和Hirotsu<sup>[6]</sup>等作了较多的研究报道;国内这方面的研究起步较晚,陈若芸<sup>[7]</sup>在他们的综述中论及灵芝中四环三萜酸的研究进展;王芳生等<sup>[8]</sup>报道了赤芝子实体中四环三萜进行了较深入的研究<sup>[9]</sup>。笔者报道了灵芝四环三萜酸的定性分析方法、紫外光谱特征及抑菌活性。

## 1 材料和方法

1.1 材料:试剂均为分析纯;硅胶(层析用)300目,青岛海洋化工厂;薄层板5×20cm,自制;753W紫外分光光度计。

## 1.2 方法

1.2.1 灵芝发酵产物中四环三萜酸的提取<sup>[6]</sup>:发酵液经真空浓缩至原体积的1/5,过滤后,用水饱和正丁醇提取3次,合并正丁醇提取液,后减压浓缩至干,残渣溶于适量的甲醇中,即为粗四环三萜酸。

1.2.2 深层发酵:25L发酵罐中培养基体积125L,发酵温度30℃,通风量1:0.75,搅拌转速180r/min,接种量1L,起始pH5.5,发酵96h。

1.2.3 抑菌实验-滤纸透明圈法<sup>[10]</sup>:①上层培养基(g/L):牛肉膏5,蛋白胨10,酵母膏5,葡萄糖5,NaCl5,琼脂18,pH7.2。下层培养基(g/L):牛肉膏3,蛋白胨5,NaCl5,琼脂20,pH7.2。

②抑菌效果评价:接种细菌浓度为10<sup>7</sup>CFU/mL,灵芝酸浓度50mg/L。抑菌圈直径5~6mm为+,7~10mm为++,抑菌圈不明显为一。

## 2 结果与讨论

2.1 灵芝中四环三萜酸薄层定性分析:利用薄层层析法进行中草药有效成分的定性分析至今仍是一种常规的检测方法。在运用该方法时首先要确定的是采用何种展开剂。我们选择4种展开剂进行实验,结果见表1。

表1 不同展开剂条件下四环三萜酸的R<sub>f</sub>值

系统1	系统2	系统3	系统4	代号
0.26	0.28	0.70	0.56	M <sub>1</sub>
0.62	0.65	0.67	0.49	M <sub>2</sub>
0.12	0.15	0.55	0.17	M <sub>3</sub>

系统1-正己烷-乙酸乙酯(1:1)

系统2-正己烷-乙酸乙酯:乙醚(1:1:1)

系统3-氯仿-乙醚-乙酸乙酯(9:1:1)

系统4-甲苯-乙酸乙酯-乙酸(12:4:0.5)

显色剂:硫酸-甲醇(1:1)溶液

由表1中可以看出,4种展开系统都有3个明显斑点,它们的R<sub>f</sub>值在0.15~0.70之间。由于展开剂的极性不同,使得各物质的R<sub>f</sub>值不同。以甲苯-乙酸乙酯-乙酸(12:4:

\* Address: Li Pingzuo, College of Biotechnology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi

0.5)为展开剂时,由于加入少量乙酸,使得分离结果非常理想。因此我们选择系统4为展开剂。

显色剂的选择:分别以三氯乙酸和硫酸-甲醇为显色剂进行实验,前者皆显黄色,加热时间长且灵敏度不高。以硫酸-甲醇(1:1)为显色剂时,加热时间短,显色速度快,120℃加热15~20 min即显色。而且以硫酸-甲醇为显色剂时,还可以判别三萜酸基本结构的饱和与不饱和情况<sup>[10]</sup>。在实验中我们观察到M<sub>1</sub>(Rf=0.56)和M<sub>2</sub>(Rf=0.49)先显亮红色,然后变为紫色;M<sub>3</sub>(Rf=0.17)则由橙色变为紫色。这表明三种灵芝中四环三萜酸都

具有不饱和特性,否则呈黄色并逐渐褪色。因此我们选择硫酸-甲醇=1:1为显色剂,图1是以系统4为展开剂时灵芝中四环三萜酸的薄层层析图谱。

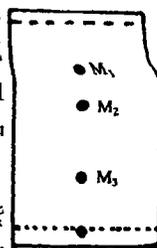


图1 灵芝四环三萜酸的薄层层析图谱

2.2 灵芝中四环三萜酸的紫外光谱特征:由于灵芝中四环三萜酸中含有共轭体系,因而在紫外区有吸收峰。将分离的3种四环三萜酸在紫外区进行吸收扫描,得到如下的谱图(图2)。

从图2中可以看出,3种四环三萜酸在

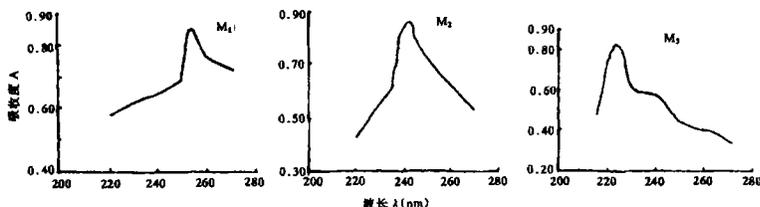


图2 M<sub>1</sub>、M<sub>2</sub>、M<sub>3</sub>紫外光谱图

220~260 nm中都有不同程度的吸收峰,已有的文献报道<sup>[7]</sup>也证明灵芝中四环三萜酸在此范围内有明显的吸收。由图2可以看出M<sub>1</sub>的最大紫外吸收峰在254 nm左右;M<sub>2</sub>的最大吸收峰在243 nm左右;M<sub>3</sub>的最大吸收峰在224 nm左右。

2.3 灵芝中四环三萜酸的抗菌活性:通过滤纸透明圈法检测了灵芝酸对不同微生物的抑菌活性。结果见表2。

表2 灵芝酸的抑菌作用

	肠炎杆菌	产气杆菌	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌	枯草杆菌
M <sub>1</sub>	++	++	++	++	+
M <sub>2</sub>	+	++	+	++	-
M <sub>3</sub>	++	+	+	++	-

### 3 小结

3.1 确定了灵芝中四环三萜酸的硅胶薄层定性分析法,适宜的展开剂组成是甲苯-乙酸乙酯-乙酸=12:4:0.5;显色剂组成是硫酸-甲醇=1:1,而且利用该显色剂可以初步判断灵芝中四环三萜酸母核上的不饱和性。分离得

到的3种灵芝三萜酸的Rf值分别为0.56,0.49,0.17。

3.2 紫外吸收光谱表明,M<sub>1</sub>的最大吸收在254 nm,与有关的报道基本相一致。在C<sub>11</sub>位不存在羰基的化合物,大都有 $\Delta^{7[8]}\Delta^{9[11]}$ 双键,其紫外吸收大多在237 nm,244 nm,253 nm,M<sub>2</sub>的紫外光谱特征在此范围内。而在既没有 $\alpha,\beta$ 不饱和酮,又没有共轭双键的化合物中,紫外吸收在 $\lambda_{max}$ 210 nm左右,M<sub>3</sub>有可能属于此范围。

3.3 抗菌实验显示3种四环三萜酸具有抑制大肠杆菌、产气杆菌、肠炎杆菌、金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌生长的活性。

### 参考文献

- Hirotsani M, et al. Chem Pharm Bull, 1986, 34:2282
- Morigiwa A, et al. Chem Pharm Bull, 1986, 34:3025
- Shiao M-S, et al. J Nat Prod, 1987, 50:886
- Kubota T, et al. Helv Chim Acta, 1982, 62:611
- Nishitoba T, et al. Agr Biol Chem, 1984, 48:2905
- Hirotsani M, et al. Chem Pharm Bull, 1986, 34:2282
- 陈若芸,等. 药学报,1990,25(12):940
- 王芳生,等. 药学报,1997,32(6):447
- 李平作. 无锡轻工大学博士论文,1997.12

## 三安胶囊质量标准的研究

福建省药品检验所(福州 35001) 潘馨\* 陈在敏 吴晓玲 许建华\*\*

三安胶囊是由海马、叶下珠、茯苓、金线莲等中药组成, 具有扶正固本, 清热解毒, 消肿之功效。用于肠癌, 肺癌等多种肿瘤疾病。为控制三安胶囊的质量<sup>[1~6]</sup>, 进行如下研究。

### 1 实验部分

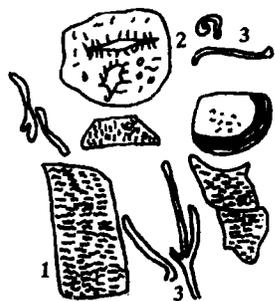
1.1 仪器与材料: 岛津 CS-930 型薄层扫描仪, 岛津 DR-2 型处理机, 定量毛细管(美国), 试剂均为 AR 级; 没食子酸(中国药品生物制品检定所), 金线莲(本所鉴定), 硅胶 G(青岛海洋化工厂生产), 三安胶囊(福州世纪星药厂)。

1.2 实验条件: 薄层色谱测定条件: 吸附剂: 硅胶 G-CMC-Na; 展开剂: 氯仿-甲醇-甲酸(10:3:2), 显色剂: 1% FeCl<sub>3</sub> 乙醇溶液, 用热风吹至显色清晰, 反射法锯齿扫描, λ=580 nm, 线性化参数 Sx=3。

### 2 实验结果

#### 2.1 鉴别

2.1.1 取本品内容物少许置显微镜下观察, 可见无色片状物, 有细密横纹, 横纹平直或微波状, 骨碎片无色, 呈长条型(检有海马)。不规则颗粒状团块, 遇水合氯醛液渐溶化。菌丝无色, 细长, 稍弯曲, 有分枝(检查茯苓)。(见图 1)



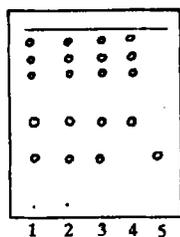
1-肌肉组织 2-骨碎片  
3-菌丝

图 1 三安胶囊显微图

2.1.2 取本品 8 g, 加 95% 乙醇 70 mL, 冷浸 6 h, 超声提取 10 min, 滤过, 蒸干, 加甲醇 2 mL 溶解, 作为供试品溶液; 另取对照药材 2 g 同法处理, 作为对照药材溶液; 再取缺金线莲的样品, 同法处理, 作为阴性对照溶液。取上述制备的三种溶液各 10 μL, 分别依次点于同一硅胶薄

层板上, 用氯仿-甲醇-甲酸(85:13:2)展开, 取出, 晾干, 喷以 2% 3,5 二硝基苯甲酸乙醇溶液, 再喷以氢氧化钾乙醇(1 mol/L), 可见供试品溶液色潜在与金线莲对照药材相应的位置上显相同颜色的斑点。(见图 2)

2.2 含量测定: 成品中含有叶下珠。叶下珠中含有没食子酸成分, 据报道没食子酸具有抗菌, 抗病毒, 抗肿瘤作用。叶下珠为方中臣药。我们确定有效成分没食子酸作为含量测定指标, 制订控制制剂质量的方法。



1-980307  
2-980312  
3-980320  
4-金线莲对照药材  
5-缺金线莲样品

图 2 样品薄层析图

2.2.1 标准品溶液的制备: 精密称取没食子酸对照品 5.01 mg 至 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容, 摇匀, 备用。

2.2.2 供试品溶液的制备: 取本品 8 g 精密称定, 置索氏提取器中, 用石油醚提取至无色, 挥干, 再用乙醇提取 5 h, 水浴上蒸至近干, 加入 0.5 g 聚酰胺粉, 挥干溶剂, 将上述粉末装入聚酰胺柱(2 g, 内径 10~12 mm)中, 先用 20 mL 水洗脱, 再用 95% 乙醇洗脱, 收集洗脱液 70 mL(薄层检查洗脱完全), 蒸干, 用乙醇溶解至 5 mL 量瓶中, 作为供试品溶液。

2.2.3 标准曲线的制备: 精密吸取上述标准品溶液 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 μL 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 依上述 1.2 薄层色谱条件测定, 以没食子酸的量为横坐标, 峰面积的积分值为纵坐标, 绘制标准曲线, 回归方程为  $Y=990+36873.8X$ ,  $r=0.9997$ , 没食子酸在 0.501~2.505 μg 范围内呈良好的线性关系。

2.2.4 精密度试验: 取供试品溶液点于同一薄层板

\* 潘馨 在福建省药品检验所工作。多年从事新药开发研制工作共十余项, 并进行科研工作, 已发表文章 10 篇。  
\*\* 福建中医学院实习生