

灵芝双向固体发酵雷公藤后菌质化学成分变化初步研究

侯志帆, 梁永红, 何礼标, 王满华, 苏明声, 罗闵丹, 谢小梅*, 杨 明*

江西中医学院 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004

摘要:目的 对灵芝双向固体发酵雷公藤所得菌质化学成分的变化进行初步研究, 针对性地分离并鉴定出发酵过程中有明显变化规律的化学成分。方法 采用高效液相色谱法对雷公藤药材及灵芝双向固体发酵雷公藤所得到的不同时间点灵雷菌质的醋酸乙酯提取物进行化学成分分析, 采用溶剂法、柱色谱法、高效液相制备法、核磁共振等对 HPLC 色谱图中部分具有明显变化规律的化学成分进行提取分离、结构鉴定。结果 与雷公藤生药相比, 发酵所得菌质的液相色谱图具有明显规律性的改变; 针对性地分离并鉴定出 4 个化合物, 分别为 12-甲氧基雷酚萜(1)、雷酚萜(2)、邻苯二甲酸二异丁酯(DIBP, 3)、邻苯二甲酸二丁酯(DBP, 4); 其中菌质中化合物 DIBP、DBP 的量随发酵时间的延长而降低。结论 灵芝双向固体发酵雷公藤的过程中, 菌质中 DIBP、DBP 等邻苯二甲酸酯类有毒化合物的量降低。

关键词: 雷公藤; 双向固体发酵; 灵雷菌质; 高效液相色谱; 邻苯二甲酸二异丁酯; 邻苯二甲酸二丁酯

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2012)02-0234-04

Chemical constituents changes in *Tripterygium wilfordii* after ganoderma bidirectional solid fermentation

HOU Zhi-fan, LIANG Yong-hong, HE Li-biao, WANG Man-hua, SU Ming-sheng, LUO Hong-dan, XIE Xiao-mei, YANG Ming

Key Laboratory of Modern Preparation of Chinese Meteria Medica, Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract: Objective To preliminarily study the chemical constituents change of *Tripterygium wilfordii* after ganoderma bidirectional solid fermentation and to isolate and identify the significant variation chemical constituents in the fermentation process. **Methods** HPLC was used to analyze the chemical constituents in *T. wilfordii* and ethyl acetate extract of *T. wilfordii* after ganoderma bidirectional solid fermentation. Solvent method, column chromatography, and HPLC preparation method were adopted to extract compounds with significant variation and NMR was used to identify their compounds. **Results** Compared with the HPLC chromatogram of *T. wilfordii* crude drug, mycoplasma chromatogram changed regularly and obviously. Four compounds were separated and identified as 12-methoxy-triptonoterpene (1), triptonoterpene (2), diisobutyl-phthalate (DIBP, 3), and dibutyl-phthalate (DBP, 4). The contents of DBP and DIBP were reduced with the extension of fermentation time. **Conclusion** During the process of fermenting, the contents of toxic chemicals such as DBP and DIBP are reduced. Because of complex chemical constituents changes, *T. wilfordii* after ganoderma bidirectional solid fermentation has lower toxicity than that in crude drug.

Key words: *Tripterygium wilfordii* Hook. f.; bidirectional solid fermentation; *Tripterygium wilfordii* Hook. f. after ganoderma solid fermentation; HPLC; diisobutyl-phthalate (DIBP); dibutyl-phthalate (DBP)

雷公藤系卫矛科植物雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 的根, 有大毒。临床主要用于治疗类风湿性关节炎、各种肾炎、系统性红斑狼疮等多种自身免疫性疾病^[1-2]。但其临床不良反应较大, 国

内外学者通过多种途径探索了降低雷公藤不良反应的方法, 均未从根本上解决雷公藤的毒性问题^[3]。

本课题组首次运用了“双向性固体发酵”的理论和方法^[4]。以灵芝为发酵菌种, 带皮的雷公藤全根

收稿日期: 2011-07-15

基金项目: 科技部国际科技合作项目(2006DFA33060); 国家“973”课题(2009CB522801)

作者简介: 侯志帆(1985—), 男, 江西东乡人, 硕士研究生, 研究方向为中药化学。Tel: 15970602596 E-mail: jzhzf@yahoo.com.cn

*通讯作者 谢小梅 Tel: (0791)87118707 E-mail: 1990xxm@sohu.com

杨 明 Tel: (0791)87119118 E-mail: yangming16@126.com

为药性基质在一定条件下经固体发酵,获得特定的灵雷菌质(G30)。通过对灵雷菌质进行急性毒性和药效学试验研究,发现灵雷菌质保持了原雷公藤药材的药效,但毒性相比于雷公藤全根药材却大为降低^[5-6],化学成分也发生了明显改变^[7]。为了进一步探索灵芝双向固体发酵雷公藤减毒持效的物质基础,本研究采用高效液相色谱法研究了雷公藤双向发酵过程中化学成分的变化规律,并针对性地分离鉴定出部分具有一定变化规律的化学成分,分别为12-甲氧基雷酚萜(1)、雷酚萜(2)、邻苯二甲酸二异丁酯(DIBP, 3)、邻苯二甲酸二丁酯(DBP, 4),从化学角度探讨灵芝双向固体发酵雷公藤的减毒持效机制。

1 材料与仪器

BS124S 电子天平(Sartorius); Waters 2695 高效液相色谱仪; Agilent 1200 半制备高效液相色谱仪; ZF—I 型三用紫外分析仪(爱朗); Bruker Avance III 400 核磁共振仪; 半制备色谱柱: Prevail C₁₈ (250 mm×100 mm, 5 μm) (Grace); Agilent 6410 液质联用仪。中性氧化铝(100~200 目, 上海纳辉干燥试剂厂); 十八烷基硅胶(ODS, 40~75 μm, 日本 YMC); 柱色谱硅胶(100~200 目, 青岛海洋化工厂); 甲醇、石油醚、三氯甲烷、醋酸乙酯均为分析纯; 高效液相用甲醇为色谱纯(TEDIA); 水经 Milli-Q 纯化系统纯化(美国 Minipore)。

雷公藤生药材(6年生)采自福建泰宁 GAP 种植基地,由江西中医学院葛菲副教授鉴定为雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 的根。雷公藤生药材 60 °C 烘干粉碎; 高温灭菌 2 h 后接种药用真菌灵芝,待菌丝长满瓶后,分别发酵 20、30、45 d 后经 60 °C 烘干得不同发酵时间的药性菌质(G20、G30、G45)。

2 方法与结果

2.1 高效液相色谱条件

Prevail C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 分析柱; 柱温: 40 °C; 进样量 10 μL; 检测波长 200~400 nm; 体积流量 1 mL/min; 流动相为甲醇-水, 梯度洗脱条件为 0~20 min, 50%~60% 甲醇; 20~30 min, 60%~70% 甲醇; 30~40 min, 70%~75% 甲醇; 40~50 min, 75%~95% 甲醇; 50~55 min, 95% 甲醇; 55~60 min, 95%~100% 甲醇。

2.2 样品提取与分离

精密称取雷公藤药材及 G20、G30、G45 各 5.000 g 置于滤纸桶, 100 mL 醋酸乙酯索氏提取至无色, 减压浓缩, 甲醇溶解提取物, 过 10 g 中性氧化铝柱,

100 mL 甲醇洗脱, 回收甲醇至干, 无水乙醇溶解并定容至 5 mL, 0.22 μm 有机滤膜滤过备用。在选定的色谱条件下, 雷公藤药材、G20、G30、G45 的色谱图见图 1。

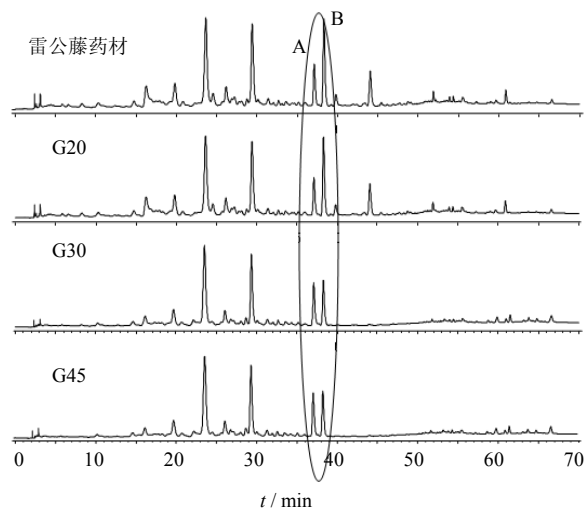


图1 雷公藤药材和 G20、G30、G45 醋酸乙酯提取物的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of crude drug, G20, G30, and G45 of *T. wilfordii*

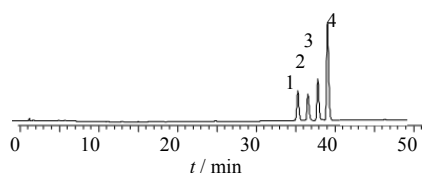
与雷公藤生药材相比, G20、G30、G45 的色谱图呈规律性变化。由于灵芝酶系对雷公藤的作用, 雷公藤中部分化学物质被降解转化, 部分新化学物质的生成, 而且改变了雷公藤中各化学成分组成的比例。紫外显示相同类型化合物色谱峰峰面积比具有明显改变, 其中以保留时间为 37.1、38.5 min 两处的色谱峰(A 和 B)最为明显, 说明该保留时间内的各化合物量的比例发生了较大改变。故对色谱峰 A 和 B 所代表的化合物进行了进一步的研究。

取雷公藤生药材 620 g, 醋酸乙酯 2 500 mL 回流提取至无色。提取液减压浓缩, 甲醇溶解, 经中性氧化铝、正相硅胶、反相 ODS 等柱色谱及半制备 HPLC 等手段, 分离得到分别为色谱峰 A、B 所代表的化合物 1~4, 各化合物色谱图见图 2。

2.3 结构鉴定

化合物 1: 白色结晶, EI-MS 在 m/z 330 处显示分子离子峰, 分子式为 C₂₁H₃₀O₃。¹H-NMR、¹³C-NMR 数据见表 1, 数据与文献报道基本一致^[8], 故鉴定化合物 1 为 12-甲氧基雷酚萜。

化合物 2: 白色结晶, EI-MS 在 m/z 300 处显示分子离子峰, 分子式为 C₂₀H₂₈O₂。¹H-NMR、¹³C-NMR 数据见表 1, 数据与文献报道基本一致^[9],



1-12-甲氧基雷酚萆 2-雷酚萆 3-邻苯二甲酸二异丁酯
4-邻苯二甲酸二丁酯
1-12-methoxy-triptonoterpene 2-triptonoterpene 3-DIBP 4-DBP

图 2 化合物 1~4 的 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of compounds 1—4

表 1 化合物 1 和 2 的 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据 (CDCl_3 , 400/150 MHz)

Table 1 $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ data of compounds 1 and 2 (CDCl_3 , 400/150 MHz)

碳位	化合物 1		化合物 2	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	34.6	1.94, 2.45 (2H, m)	37.1	1.90 (2H, m)
2	37.6	2.54 (2H, m)	34.7	2.60 (2H, m)
3	217.0		217.1	
4	47.3		47.3	
5	55.8	2.82 (1H, m)	50.1	2.90 (1H, m)
6	19.6	1.98 (2H, m)	19.6	1.82 (2H, m)
7	24.3	2.79 (1H, m)	24.6	2.70 (2H, m)
8	114.1		120.8	
9	151.7		146.3	
10	37.4		37.6	
11	100.1	6.39 (1H, s)	117.2	6.85 (1H, d, $J = 7.0$ Hz)
12	156.8		123.6	7.06 (1H, d, $J = 7.0$ Hz)
13	119.3		130.4	
14	146.1		150.1	
15	24.2	3.49 (1H, septet, $J = 7.0$ Hz)	26.9	3.13 (1H, septet, $J = 7.0$ Hz)
16	20.9	1.15 (3H, d, $J = 7.0$ Hz)	22.4	1.15 (3H, d, $J = 7.0$ Hz)
17	21.1	1.15 (3H, d, $J = 7.0$ Hz)	22.7	1.15 (3H, d, $J = 7.0$ Hz)
18	26.7	1.17 (3H, s)	24.3	1.25 (3H, s)
19	20.8	1.32 (3H, s)	26.6	1.28 (3H, s)
20	24.2	1.33 (3H, s)	21.2	1.34 (3H, s)
21	50.1	3.77 (3H, s, $-\text{OCH}_3$), 4.75 (1H, s, $-\text{OH}$)	37.1	4.71 (1H, s, $-\text{OH}$)

3 讨论

雷公藤的化学成分十分复杂, 其药效和毒性并不是由某一两种化合物所决定的, 而是多种成分综合作用的结果。在同一色谱条件下, 与雷公藤生药相比 (图 1), G20、G30、G45 醋酸乙酯提取物的色谱图呈规律性的变化, 菌质中雷公藤重要活性及毒性物质雷公藤甲素所在区域 (保留时间为 6~7 min), 色谱峰面积成规律性下降, 发酵至 30 d 时保留时间为 44 min 处的色谱峰已消失, 说明该色谱峰所代表的化合物已被转化。保留时间 2~8、14~17、35~40 min 处, 色谱峰的峰面积呈规律性下降, 且较为明显, 说明该保留时间内的化合物的量不断下

故鉴定化合物 2 为雷酚萆。

化合物 3: 淡黄色油状物, EI-MS 在 m/z 288 处显示分子离子峰, 分子式为 $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_4$ 。 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据见表 2, 数据与文献报道基本一致^[10], 故鉴定化合物 3 为邻苯二甲酸二异丁酯 (DIBP)。

化合物 4: 无色油状液体, EI-MS 在 m/z 288 处给出分子离子峰, 分子式为 $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_4$ 。 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据见表 2, 数据与文献报道基本一致^[11], 故鉴定化合物 4 为邻苯二甲酸二丁酯 (DBP)。

降。保留时间 35~40、61~62 min 处, 紫外显示相同类型化合物不同色谱峰峰面积的比例具有明显改变, 说明该保留时间内的化合物量的比例发生了较大改变。保留时间 63~67 min 处, 部分色谱峰峰面积有所增加, 并伴有新的色谱峰的出现, 说明部分化学成分量提高, 并有新的化学物质生成。

根据雷公藤生药与 G20、G30、G45 的醋酸乙酯提取物色谱图的变化规律, 以保留时间在 37.1、38.5 min 处色谱峰所代表的化合物为研究对象, 本实验从雷公藤生药中分离出化合物 12-甲氧基雷酚萆、雷酚萆、DBP、DIBP。其中 DBP、DIBP 属于邻苯二甲酸酯类物质 (phthalates), 邻苯二甲酸

表2 化合物3和4的¹H-NMR、¹³C-NMR数据(CD₃OD, 400/150 MHz)
Table 2 ¹H-NMR and ¹³C-NMR data of compounds 3 and 4 (CD₃OD, 400/150 MHz)

碳位	化合物3		化合物4	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
7	169.2		169.2	
1, 6	133.5		133.5	
2, 5	129.8	7.71 (1H, dd, $J = 5.7, 3.3$ Hz)	129.8	7.72 (1H, m)
3, 4	132.2	7.62 (1H, dd, $J = 5.7, 3.3$ Hz)	132.2	7.60 (1H, m)
1', 1''	72.9	4.06 (2H, d, $J = 6.4$ Hz)	66.6	4.29 (2H, m)
2', 2''	28.9	2.05 (1H, m)	31.7	1.72 (2H, m)
3', 3''	19.3	0.92 (6H, d, $J = 6.7$ Hz)	20.2	1.46 (2H, m)
4', 4''	19.3	0.92 (6H, d, $J = 6.7$ Hz)	14.0	0.97 (3H, m)

酯类化合物是一类环境内分泌干扰素,具有致畸、致癌、致突变性、遗传毒性及生殖毒性。可导致体外大鼠各脏器细胞(肝脏、肺、肾脏、睾丸)SOD酶活性降低,具有显著的氧化损伤作用^[12-13]。随着灵芝固体发酵雷公藤的时间延长,此两种化合物的量不断下降。说明灵芝双向固体发酵雷公藤的过程中,灵芝中的酶系不仅对雷公藤中二萜类化合物产生了较大的影响^[14],而且降低了邻苯二甲酸酯类有毒化合物的量。推测由于这种复杂的化学成分的改变,使得灵芝双向固体发酵雷公藤所得到的灵雷菌质保持了雷公藤原药材的药效,但毒性相比于雷公藤全根药材却大为降低。

本课题将继续对雷公藤 G20、G30、G45 醋酸乙酯提取物的色谱图中其他具有规律性变化的化学物质进行分离鉴定,进一步从化学角度阐明灵芝双向固体发酵雷公藤的减毒持效机制。

参考文献

- [1] 阙慧卿,耿莹莹,林 媛,等. 雷公藤化学成分研究[J]. 中草药, 2005, 36(11): 1624-1625.
- [2] 刘为萍,刘素香,唐慧珠,等. 雷公藤研究新进展[J]. 中草药, 2010, 41(7): 1215-1218.
- [3] 李 波,周昕欣,梁茂新,等. 雷公藤配伍减毒增效研究与展望[J]. 中国中西医结合杂志, 2006, 26(11): 1044-1045.
- [4] 孙 静,马 琳,吕斯琦,等. 中药发酵技术研究进展[J]. 药物评价研究, 2011, 34(1): 49-52.
- [5] 王卫倩,戴丹丹,罗闯丹,等. 灵雷菌质的急性毒性实验研究[J]. 中国食用菌, 2008, 27(3): 36-38.
- [6] 谢小梅,贺 婧,罗闯丹,等. 灵芝双向发酵雷公藤的解毒持效作用[J]. 中草药, 2009, 40(12): 1925-1929.
- [7] 张普照,舒任庚,谢小梅. 双向固体发酵后雷公藤菌质化学成分研究[J]. 中国食用菌, 2008, 27(1): 41-42.
- [8] Wu X Y, Qin G W, Xu R S, et al. Abietane diterpenes from *Tripterygium wilfordii* [J]. *Planta Med*, 1994, 60(2): 189-191.
- [9] 汪云松,黄 荣,杨靖华. 火把花二萜化学成分研究[J]. 中草药, 2010, 41(8): 1252-1254.
- [10] 于德泉,杨峻山. 分析化学手册:核磁共振分册[M]. 北京:化学工业出版社, 1999.
- [11] 严 振,田 洋,马跃平,等. 雷公藤根化学成分研究[J]. 中国现代中药, 2010, 12(1): 23-24.
- [12] 吴建元,肖玉玲,丁 虹,等. 雷公藤片对小鼠睾丸组织的毒性作用及其分子机制研究[J]. 中药材, 2005, 28(3): 207-210.
- [13] 张蕴辉,陈秉衡. 邻苯二甲酸二丁酯研究进展[J]. 卫生研究, 2003, 32(4): 407-409.
- [14] 张普照,杨丽娟,侯志帆,等. 雷公藤双向固体发酵过程中的化学成分变化研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(10): 59-62.