

指纹图谱和体外细胞活性跟踪相结合考察温度
对灵芝中三萜类成分的影响

杜萌¹, 刘璇¹, 陈彦^{2*}, 丁安伟^{3*}

(1. 南京中医药大学附属江苏省中西医结合医院, 南京 210028; 2. 国家中医药管理局中药释药系统重点研究室, 江苏省中医药研究院中药新型给药系统重点实验室, 南京 210028; 3. 南京中医药大学、江苏省方剂高新技术研究重点实验室, 南京 210046)

〔摘要〕 目的:探讨温度对灵芝中主要抗肿瘤活性三萜类成分含量的影响。方法:采用 HPLC 灵芝醇提取物中三萜类成分在不同温度处理后的指纹图谱的变化,并结合体外人肺癌 SPC-A-1 细胞株,通过 MTT 法评价不同温度影响下的灵芝提取物对肿瘤细胞增殖的抑制作用。结果:灵芝中三萜类成分显著受到温度的影响。在选定的 20 个特征峰中,第 4、14、15、16 号峰的峰面积变化经 100 ℃ 加热处理后最为显著,与未加热处理的灵芝提取物的色谱峰相比,这 4 个峰的峰面积下降幅度分别高达 42.601%、35.909%、49.359%、64.061%。体外细胞活性实验表明经不同温度处理下的灵芝提取物的抗肿瘤活性不同,灵芝提取物的 IC₅₀ 由 1.44 g·L⁻¹ (醇提取物) 升高到 2.77 g·L⁻¹ (100 ℃ 下处理的样品)。结论:温度可显著影响灵芝抗肿瘤活性三萜类成分的含量变化,高温易造成其活性成分的损失,进而引起灵芝抗肿瘤活性的降低。

〔关键词〕 灵芝; 三萜类成分; 温度; 抗肿瘤活性

〔中图分类号〕 R284.1 〔文献标识码〕 A 〔文章编号〕 1005-9903(2012)10-0104-05

Studies on the Influence of Temperature on the Stability of Triterpenes
in *Herba Ganoderma lucidum* by HPLC and
Anti-tumor Activity Assays *in vitro*

DU Meng¹, LIU Xuan¹, CHEN Yan^{2*}, DING An-wei^{3*}

(1. Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu Province Hospital on Integration of Chinese and Western Medicine, Nanjing 210028, China; 2. Key Laboratory of Multi-delivery System of Chinese Materia Medica of State Administration of Traditional Chinese Medicine (TCM), Key Laboratory of New Drug Delivery System of Chinese Meteria Medica, Jiangsu Provincial Institution of TCM, Nanjing 210028, China; 3. Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu Key Laboratory for High Technology Research of TCM Formulae, Nanjing 210046, China)

〔Abstract〕 **Objective:** To study the influence of temperature on the stability of the triterpenes in *Ganoderma lucidum*. **Method:** Investigating the differences in the HPLC fingerprints of the ethanol extract of *G. lucidum* treated at different temperatures, and SPC-A-1 cells were used to evaluate the inhibitory effects *in vitro* of these different extracts on tumor cell growth by MTT assays. **Result:** Triterpenes contents of *G. lucidum* could be significantly affected by temperature. In the 20 selected chromatographic peaks, the area changes of peak 4, 14, 15, 16 were most obvious. Compared with unheated ethanol extract, the descending range of the four peak areas in

〔收稿日期〕 20111030(003)

〔基金项目〕 江苏省中医药领军人才项目(LJ200913)

〔第一作者〕 杜萌,在读硕士,从事中药复方及新药研究,Tel:15951831768,E-mail:dumeng1217@163.com

〔通讯作者〕 * 陈彦,博士,研究员,从事中药制剂研究,Tel:025-85608672,E-mail:yichen202@yahoo.com.cn

* 丁安伟,教授,博士生导师,从事中药新药研究与开发,Tel:025-85811523,E-mail:awding105@163.com

the ethanol extract treated at 100 °C were 42.601% , 35.909% , 49.359% , 64.061% , respectively. Results *in vitro* showed that the ethanol extract treated at different temperatures had different anti-tumor activities. The IC_{50} of unheated ethanol extract was 1.44 mg crude drug · mL⁻¹, however, after the ethanol extract treated at 100 °C , the IC_{50} increased to 2.77 mg crude drug · mL⁻¹. **Conclusion:** Results indicated that temperature could significantly affect the contents of the triterpenes in *G. lucidum*. High temperature could easily lead to the loss of its active components, thus decreasing its anti-tumor activity.

[**Key words**] *Ganoderma lucidum*; triterpenes; temperature; anti-tumor activity

灵芝为多孔菌科真菌赤芝或紫芝的干燥子实体^[1],最早记载于汉代《神农本草经》,具有滋补强壮、延年益寿、宁心安神、扶正固本之功效^[2-5]。通过对其化学、药理、临床等领域的大量研究,发现灵芝可用于糖尿病、高血压、肿瘤等多种疾病的治疗,其中对肿瘤的治疗引起高度关注^[6-8]。灵芝中的化学成分非常复杂,三萜类化合物是从灵芝中分离得到的一类具有抗肿瘤活性的有效成分,但因其极性较小,且性质不稳定,一般需采用有机溶剂在常温或低温下提取^[9-12]。然而药材在提取、分离、浓缩、干燥、制备和制剂的过程中,不可避免地会受到温度的影响,由此造成药材中有效成分的破坏,从而降低药材的药效。因此本实验设计了三个生产实践上的常用温度即低温40 °C、常规减压浓缩温度60 °C、常压浓缩温度100 °C,分别对灵芝醇提取物进行处理,并结合体外细胞活性跟踪,深层次地探讨温度对灵芝中三萜类成分及其抗肿瘤作用的影响,为灵芝在临床制剂中充分地发挥自身药效作用提供研究依据。

1 材料

Agilent HP 1100 型高效液相色谱仪(美国Agilent 科技公司),METTLER TOLEDO 型分析天平(METTLER TOLEDO 分析仪器有限公司),恒温水浴锅(金坛市双捷实验仪器厂),HERA CELL150 CO₂ 型培养箱(美国热电集团),COIC XDS-1B 型相差倒置显微镜(重庆光电仪器总公司),酶标仪(美国热电集团),LDZX-50KB 型立式压力蒸气除菌锅器(上海申安医疗器械厂),Anke TDL-40B 型离心机(上海安亭科学仪器厂),液氮罐(美国热电公司),96 孔培养板(Greiner Bio-one 公司),细胞计数板(上海市求精生化仪器厂)。

灵芝子实体由江苏盐城神农保健食品有限公司惠赠,经中国科学院微生物研究所文华安研究员鉴定为赤芝 *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Krast. 的干燥子实体,二甲基亚砜(分析纯,国药集团化学试剂有限公司),MTT(Sigma 公司),RPMI-1640 培养基(Gibco 公司),新生小牛血清(杭州四季青公

司),胰蛋白酶溶液(Gibco 公司),顺铂(南京制药厂有限公司),四甲基偶氮唑盐(MTT, SunShine 公司),甲醇、乙腈、磷酸为色谱纯;水为重蒸水,其余试剂均为分析纯。

人肺癌细胞株 SPC-A-1,购于中科院上海生命科学院生物化学与细胞生物研究所。

2 方法与结果

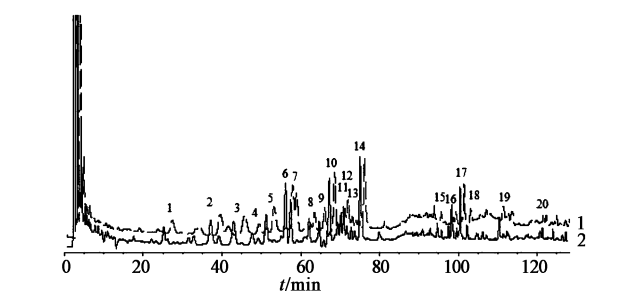
2.1 不同温度处理下灵芝提取物的 HPLC 图的比较

2.1.1 灵芝提取物的制备 将灵芝饮片粉碎,过12 目筛,称取粗粉20 g,加入6 倍量的90%乙醇,加热回流提取2 次,每次1 h,合并提取液,过滤,用90%乙醇定容至250 mL,即得。

2.1.2 不同温度处理下的灵芝供试液的制备 取2.1.1 项下已制备的醇提液4 份,每份50 mL,1 份不加热;其余3 份,分别置于100 mL 蒸发皿中,在40,60,100 °C 的恒温水浴锅上均加热3.5 h 至干,残渣分别用90%乙醇溶解,定容于10 mL,摇匀,即得供试品溶液。注入HPLC 色谱仪中进行分析。

2.1.3 色谱条件^[13] ZORBAX SB C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),流动相乙腈(A)-0.05% 磷酸(B);梯度洗脱(0~40 min, 27% A, 73% B;40~60 min, 27%~35% A, 73%~65% B;60~80 min, 35%~45% A, 65%~55% B;80~90 min, 45%~65% A, 55%~35% B;90~100 min, 65%~75% A, 35%~25% B;100~110 min, 75%~85% A, 25%~15% B;110~120 min, 85%~100% A, 15%~0% B;120~128 min, 100% A);流速1.0 mL·min⁻¹,检测波长254 nm,柱温30 °C。在此条件下,灵芝中的三萜类成分可得到较好分离。HPLC 图见图1。

由HPLC 图得知灵芝中的三萜类成分在128 min 内已基本洗脱完全。据文献报道,灵芝三萜类成分的相对分子质量一般为400~600^[14],化学结构非常复杂,其成分为高度氧化的羊毛甾烷衍生物,在紫外光谱图中呈现出多个波长的特征吸收,多数在



1. 未加热; 2. 100 °C 处理下

图 1 不同温度处理下灵芝提取物的 HPLC

250,237,365 nm 有吸收峰^[4]。由此,依据灵芝三萜

类成分的紫外特征吸收,选取了峰面积 >100 的 20 个特征吸收峰作为目标成分峰,通过比较这 20 个峰的峰面积变化情况来考察温度对灵芝三萜类成分的影响。

结果发现,未加热的灵芝提取物与经 40, 60,100 °C 加热处理 3.5 h 后的灵芝提取物中的三萜类成分无差异,但其峰面积有显著变化,且不同温度处理后灵芝提取物中三萜类成分含量的变化程度不同。不同温度处理下灵芝提取物中 1~20 号峰的峰面积变化见表 1。

表 1 不同温度处理下灵芝提取物中 1~20 号峰的峰面积变化

色谱峰	峰面积(下降趋势)			
	未加热处理的 灵芝提取物	40 °C 处理下的 灵芝提取物	60 °C 处理下的 灵芝提取物	100 °C 处理下的 灵芝提取物
1	355	306(13.803%)	303.1(14.620%)	228.5(35.634%)
2	485	475.1(2.041%)	467(3.711%)	460.1(5.134%)
3	682.6	592.6(13.185%)	569.7(16.540%)	507.5(25.652%)
4	256.1	196.1(23.428%)	196.6(23.233%)	147(42.601%)
5	602	503.5(16.362%)	506.4(15.880%)	475.1(21.080%)
6	865	848(1.965%)	824.6(4.671%)	821.6(5.017%)
7	685.3	683(0.336%)	682(0.482%)	615.5(10.185%)
8	251.5	250(0.596%)	226.9(9.781%)	222.8(11.412%)
9	400.8	381.2(4.890%)	366.2(8.633%)	305.8(23.703%)
10	928.8	850.6(8.419%)	676.8(27.132%)	631.2(32.041%)
11	356.7	349.6(1.990%)	332.6(6.756%)	306.3(14.130%)
12	355.5	327.7(7.820%)	311.8(12.293%)	270.9(23.797%)
13	101.7	100.8(0.885%)	87.1(14.356%)	78.2(23.107%)
14	1 254	964.6(23.078%)	887.2(29.250%)	803.7(35.909%)
15	156	96.9(37.885%)	86(44.872%)	79(49.359%)
16	197	128.3(34.873%)	98(50.254%)	70.8(64.061%)
17	468.5	457.5(2.348%)	440.7(5.934%)	403.7(13.831%)
18	153	144.1(5.817%)	136.9(10.523%)	134.7(11.961%)
19	180	178.3(0.944%)	176.9(1.722%)	170.5(5.278%)
20	123.9	121.9(1.614%)	113.6(8.313%)	108.9(12.107%)

结果显示,通过对不同温度处理下灵芝提取物中这 20 个峰的峰面积变化程度的比较,发现灵芝三萜类成分很不稳定,易受到加热温度的影响。其峰面积变化趋势线清晰地显示,随着受热温度的升高,其成分含量呈现下降趋势,其中第 4,14,15,16 号峰的峰面积下降幅度最大,且 100 °C 高温处理 3.5 h 后其成分含量下降接近一半。

2.2 不同温度处理下灵芝提取物的体外细胞活性跟踪

2.2.1 SPC-A-1 细胞培养及处理 将人肺癌 SPC-

A-1 细胞株置于含 10% 新生小牛血清、100 U·mL⁻¹ 青霉素、100 mg·L⁻¹ 链霉素的 RPMI 1640 培养基中培养,37 °C,5% CO₂ 培养箱内贴壁生长 3~4 代后,取对数生长期的细胞用于实验。

2.2.2 MTT 法测定抗肿瘤活性 将对数生长期细胞用胰酶消化,用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基配制成 15×10⁴ 个/mL 密度的细胞悬液,然后接种到 96 孔培养板,每孔 100 μL,培养 24 h 后,弃去含小牛血清的培养基,每孔加入 90 μL 无血清培养,及 10 μL 不同浓度的灵芝提取物和经不同温度

处理下的的灵芝提取物,最终浓度分别为 4.0,2.8,1.8,1.4,1.0 g·L⁻¹,有机溶剂乙醇最终质量分数小于 1%。阳性药物给予 40 mg·L⁻¹的顺铂溶液,终浓度设为 4.0,2.0,1.0,0.5,0.25 mg·L⁻¹。空白组给予等体积的 PBS 溶液。每组设 3 个复孔,继续培养 36 h 后,每孔分别加入 10 μL 的 MTT 溶液(5 g·L⁻¹),培养 4 h 后终止,弃去孔中上清液,每孔加入 100 μL DMSO,用微型振荡器振荡 10 min 后,用酶标仪测定每孔吸光度(A),检测波长为 550 nm,参比波长为 690 nm,平行测定 3 次,取平均值。计算药液对细胞生长抑制率,用 SPSS 11.5 软件求其半

数抑制浓度(IC₅₀)。顺铂和灵芝提取物的测定结果见表 2~3。

细胞生长抑制率 = (1 - A_{实验组} / A_{空白组}) × 100%

表 2 顺铂对 SPC-A-1 细胞增殖的抑制作用($\bar{x} \pm s, n = 9$)

顺铂浓度/(mg·L ⁻¹)	抑制率/%
4.0	93.53 ± 0.51
2.0	67.21 ± 1.20
1.0	51.45 ± 0.90
0.5	43.29 ± 0.82
0.25	29.90 ± 1.54

表 3 不同温度处理下灵芝提取物对 SPC-A-1 细胞增殖的抑制作用($\bar{x} \pm s, n = 9$)

%

质量浓度 /g·L ⁻¹	抑制率			
	灵芝提取物	40 ℃ 处理下的 灵芝提取物	60 ℃ 处理下的 灵芝提取物	100 ℃ 处理下的 灵芝提取物
4.0	95.93 ± 0.06	93.02 ± 0.10	82.42 ± 0.80	65.02 ± 0.10
2.8	86.80 ± 0.05	76.16 ± 0.61	68.93 ± 0.37	46.70 ± 0.39
1.8	65.07 ± 1.69	55.99 ± 0.13	50.31 ± 0.21	37.82 ± 0.56
1.4	49.64 ± 0.14	47.11 ± 0.19	37.69 ± 0.50	25.75 ± 0.44
1.0	25.65 ± 0.33	23.00 ± 0.11	21.25 ± 2.48	13.69 ± 2.79

结果表明,灵芝提取物能明显抑制 SPC-A-1 细胞的增殖。在相同给药剂量的条件下,不同温度处理下灵芝提取物的抗肿瘤活性呈现显著变化,且随着处理温度的升高,灵芝提取物对肿瘤细胞生长的抑制率逐渐下降。由此证明灵芝提取物的抗肿瘤活性的改变与色谱图中峰面积的变化呈现正相关性。

3 讨论

本课题的前期研究中,采用 MTT 细胞活性实验对灵芝三萜类成分进行活性筛选时中发现,经过加热提取、回收浓缩制备得到的灵芝提取物的抑瘤活性存在显著差异。因此推断受热温度是造成灵芝提取物抑瘤活性改变的关键因素,即温度对灵芝中的抗肿瘤活性成分造成破坏。

为验证此推断,本课题设计了温度对灵芝中三萜类成分的影响实验。通过灵芝提取物的 HPLC 指纹图谱分析,发现灵芝中的三萜类成分在高温下很不稳定,易受到温度的影响,即随着受热温度的升高,其含量呈现显著地下降趋势。体外细胞活性实验跟踪发现,灵芝提取物对人肺癌 SPC-A-1 细胞的增殖有明显抑制作用,并呈现剂量依赖关系,经过不同温度处理后,其对肿瘤细胞的抑制率有所改变,且随着温度的升高,灵芝提取物对肿瘤细胞的半数抑制浓度提高即抗肿瘤活性下降。

液相表征和体外细胞活性实验充分说明,灵芝的抗肿瘤活性和 HPLC 指纹图谱的峰面积具有相关性,即温度造成了灵芝中抗肿瘤活性三萜类成分含量的改变,进而给灵芝的抑瘤效果带来显著影响。因此灵芝中易受到高温影响的活性成分更应值得关注。然而在工业大生产中,药材会不可避免地受到温度的影响,由此会造成药材中有效成分的损失,为保证灵芝的药效作用,加热温度是把握其活性的关键。因此,灵芝在加工炮制干燥、提取、回收浓缩以及制备相关制剂的操作过程中,应充分考虑高温对药材中活性成分的影响,采用低温对灵芝进行加工处理,尽可能地减少因温度对药效成分造成的影响,从而使灵芝这一重要的中药资源能充分发挥自身最大的药效作用,保证其在临床疗效中的可重复性。

[参考文献]

[1] 中国药典. 一部[S]. 2010:174.
[2] 史俊青,张丽萍,杨春清,等. 不同品种灵芝多糖含量差异研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(13):104.
[3] 王彦松,顾明,赵杰东. 灵芝药用进展[J]. 西南国防医药,2004,14(6):680.
[4] 高建莉,禹志领,李绍平,等. 灵芝三萜类成分研究进展[J]. 中国食用菌,2002,24(4):6.

野葛及药材生物学特性的初步研究

纪宝玉,裴莉昕,陈随清*,董诚明
(河南中医学院药学院,郑州 450008)

[摘要] 目的:解野葛生长习性和葛根活性物质含量的动态变化。方法:以实地调查的方式观测野葛的生长发育情况,《中国药典》方法测定醇溶性浸出物的含量,高效液相法测定葛根中葛根素、大豆苷、大豆苷元的含量,紫外分光光度法测定总黄酮含量,苯酚-硫酸法测定葛根多糖含量。结果:初步揭示了野葛的生长发育情况;发现葛根中各活性物质含量变化有一定规律,1~12 月份中以 8,9 月份各活性物质含量最高,不同年限葛根各活性物质含量随年限增长而增高。结论:研究了野葛生长发育过程与葛根各活性物质积累之间的关系和机制,为野葛的采收、合理开发利用提供一定的科学依据。

[关键词] 野葛;生物学特性;生长习性;有效成分

[中图分类号] R282 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)10-0108-05

Study on Biological Character of *Pueraria lobata* and Medicinal Materials

Ji Bao-yu, PEI Li-xin, CHEN Sui-qing*, DONG Cheng-ming
(School of Pharmacy, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

[Abstract] **Objective:** Studies on growth habit of *Pueraria lobata* and dynamic changes of the active substance content of puerariae Lobatae Radix. **Method:** The method of determining the content of alcohol-soluble chemical composition was in line with Pharmacopeia; puerarin, aidzin, daidzein were determinated by HPLC. The contents of flavonoids were assayed by ultraviolet spectroscopy. The contents of polysaccharide were determined by phenol-sulfuric acid method. **Result:** This paper elementarily reveals growth habit of *Pueraria lobata*. The content of active substance appeared regular changes and was highest in August and September of perennial Puerariae Lobatae Radix. **Conclusion:** This result fruther provides scientific basis for resoures protection, rational

[收稿日期] 20111102(008)
[基金项目] 科技部“十一五”科技支撑计划项目(2006BAI06A10)
[第一作者] 纪宝玉,硕士,讲师,从事中药规范化种植及质量标准研究,Tel:13607669844, E-mail:jby19820429@yahoo.com.cn
[通讯作者] *陈随清,博士,教授,从事中药品种整理及质量标准研究,Tel:0371-65676686,E-mail:suiqingchen@sohu.com

[5] 王丹花,翁新楚. 灵芝抗癌活性及放化疗对 HL-7702 细胞的保护作用[J]. 中国中药杂志,2006,31(19):1618.

[6] 唐庆九,季哲,郝瑞霞,等. 灵芝中性三萜类成分的抗肿瘤作用[J]. 食用菌学报,2010,17(1):60.

[7] 丁平,梁英娇,罗进辉,等. 灵芝中 6 种主要三萜酸类成分的 HPLC 定量分析[J]. 中国药学杂志,2009,44(11):822.

[8] 刘思好,王艳,何蓉蓉,等. 灵芝的化学成分[J]. 沈阳药科大学学报,2008,25(3):183.

[9] 高建莉,禹志领,李绍平,等. 灵芝三萜类成分研究进展[J]. 中国食用菌,2004,24(4):6.

[10] 蔺丽,方能虎,吴旦. 灵芝有效成分的研究概况[J]. 中成药,2002,24(10):793.

[11] 钟小清,徐鸿华. 灵芝研究概况[J]. 广西中医药,1999,22(6):314.

[12] 王瑜杰,丁安伟,张丽. 灵芝三萜类成分提取分离和质量控制研究进展[J]. 中国药业,2008,17(24):60.

[13] 贾晓斌,宋师花,陈彦,等. 超临界 CO₂ 萃取法和醇回流法提取灵芝中三萜类成分的比较[J]. 中成药,2010,32(5):868.

[14] 陆慧,贾晓斌,韦英杰,等. 灵芝三萜类成分油水分配系数的测定及其在体肠吸收[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(21):12.

[责任编辑 蔡仲德]