

文章编号:1673-1689(2008)03-0060-04

一种灵芝三萜皂甙新物质的分离鉴定和结构推断

崔月花¹, 丁重阳², 章克昌²

(1. 扬州大学 生物科学与技术学院, 江苏 扬州 225009; 2. 江南大学 教育部工业生物技术重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘 要: 通过凝胶色谱和反相硅胶柱色谱从灵芝发酵液中分离得到一种新物质, 定性检验该物质为灵芝三萜皂甙, 通过反相高效液相色谱鉴定其纯度为 94.45%。进一步用质谱, 红外, 紫外对其分子结构进行初步推断, 这种皂甙是一个连有 1 个糖基的母核荷质比为 402、相对分子质量为 564 的皂甙。

关键词: 灵芝; 皂甙; 分离; 纯化; 质谱; 结构推断

中图分类号: S 642.5

文献标识码: A

Separation, Purification and Structure Deduction of a Saponin from *Ganoderma lucidum*

CUI Yue-hua¹, Ding chong-yang², ZHANG Ke-chang²

(1. College of Bioscience and Biotechnology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education and Laboratory of Biomass Resources, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: A new saponin was isolated from *G. lucidum* using a combination of gel chromatogram and reversed-phase silica gel column chromatography. The purity of the saponin was 94.45% by determined with RP-HPLC. The MS showed that the saponin had one glycosides, the m/z of the glycon was 402 and the molecular weight was 564.

Key words: *Ganoderma lucidum*; saponin; isolation; purification; MS; structure detection

灵芝(*Ganoderma lucidum*)是一种传统的名贵中药。因含有糖苷,有特殊苦味。灵芝含有糖类、核苷类、呋喃类、生物碱类、氨基酸蛋白质类、三萜类、油脂类、有机锗化合物类^[1]等等,其中多糖和三萜类研究得很多,是灵芝起疗效作用的重要成分。从灵芝的子实体、孢子、菌丝体和发酵液中分离出的多糖和三萜类具有抗肿瘤、抗乙肝病毒等多方面的作用^[1-3]。近年来,灵芝的药用价值日益受

到国内外学者的高度关注。关于灵芝三萜类的分离纯化,国内外已有初步的研究^[4,5],但对灵芝三萜皂甙的分离研究较少。作者拟用大孔树脂、凝胶柱色谱分离,最后用反相硅胶柱纯化,得到高纯度的灵芝三萜皂甙,并结合质谱方法来初步推断皂甙的相对分子质量与分子结构,为研究灵芝三萜皂甙的分离纯化提供了一定的参考。

收稿日期:2007-06-03.

作者简介:崔月花(1971-),女(蒙古族),内蒙古赤峰人,工学博士,讲师,主要从事发酵工程等方面的研究. Email: yhcui@yzu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 器材

灵芝(*G. lucidum*)发酵液:江南大学生物工程学院提供。

大孔树脂 HPD-400:河北沧州宝恩化工厂产品;C-18:粒度 $20 \sim 40 \mu\text{m}$,日本岛公司产品;Sephadex LH20:粒度 $0.22 \mu\text{m}$,Sigma 公司产品;DPPH:Sigma 公司产品;SHZ-3 型水循环真空泵:无锡星海生化仪器公司产品;BT₁-100 恒流泵:上海琪特分析仪器有限公司产品;玻璃层析柱 $D 1.2 \text{ cm} \times 30 \text{ cm}$,上海华美层析设备厂产品;HD-21-88 型紫外检测器:上海琪特分析仪器有限公司产品;Nicolet Nexus 傅里叶变换红外光谱仪:Thermo Electron Corporation 产品;Waters ZMD 4000 型液质联用仪:美国 Waters 公司产品;Waters ZMD 4000 型二极管阵列检测器:美国 Waters 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 分离纯化 将灵芝发酵液用体积分数 70% 的乙醇沉淀后,去掉部分蛋白质和多糖等大分子物质,上清液浓缩,用石油醚萃取,去掉油脂等,水相浓缩后,用等体积的正丁醇萃取,正丁醇相经大孔树脂 HPD400 去处杂质,将经大孔树脂体积分数 20% 乙醇洗脱液反复过 Sephadex LH20 柱,再经过反相 ODS 层析得到灵芝三萜皂甙。

1.2.2 纯度鉴定 反相高效液相色谱条件:色谱柱 ZorbaxSB C18 ($D 416 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$);柱温 30°C ;流动相:甲醇:0.4% 甲酸水溶液;体积流量 1 mL/min ;进样量 $10 \mu\text{L}$;检测器 ELSD。

1.2.3 质谱分析条件 MS 条件:ESI-MS 锥孔电压 60 V ,毛细管电压 3.88 kV ,离子源温度 120°C ,脱溶剂气温度 300°C ,柱温 35°C ;进样量 $5 \mu\text{L}$,体积流量 1 mL/min 。

1.2.4 红外光谱检测方法 制样方法:液膜法;扫描次数 256 次;分辨率 4 cm^{-1} 。

2 结果与讨论

2.1 灵芝三萜皂甙的定性

泡沫反应是皂甙反应的一个特点,实验中发现灵芝皂甙水溶液能产生蜂窝状泡沫,持久(15 min 内)不消失;冰醋酸浓硫酸试验时,溶液的颜色变化是棕红色—紫色—墨绿色;氯仿浓硫酸试验体系中,颜色是氯仿层红色,浓硫酸层绿色,这是三萜类的反应。以上是三萜和皂甙的特征反应,两种反应均为阳性,初步证明了该物质是灵芝三萜皂甙。

万方数据

2.2 灵芝三萜皂甙的纯度鉴定

反相高效液相色谱(RP-HPLC)检测灵芝三萜皂甙的纯度,HPLC 验证,结果是一个单一的峰,见图 1。归一化法求得纯度为 94.13%,由此可见,此物质是纯的化合物。

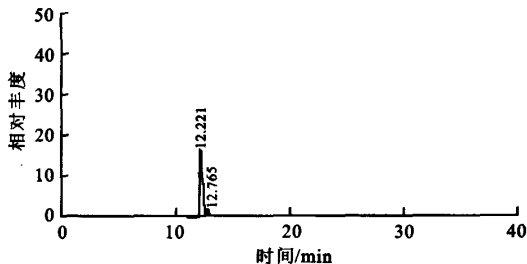


图 1 灵芝三萜皂甙 RP-HPLC 图

Fig. 1 RP-HPLC spectrum of the saponin from *G. lucidum*

2.3 灵芝三萜皂甙的结构推断

2.3.1 质谱分析 在图 2 中,保留时间为 10.04 min 的峰为化合物 GCTL1,其正离子色谱峰的保留时间为 10.14 min,负离子色谱峰的保留时间为 10.19 min。

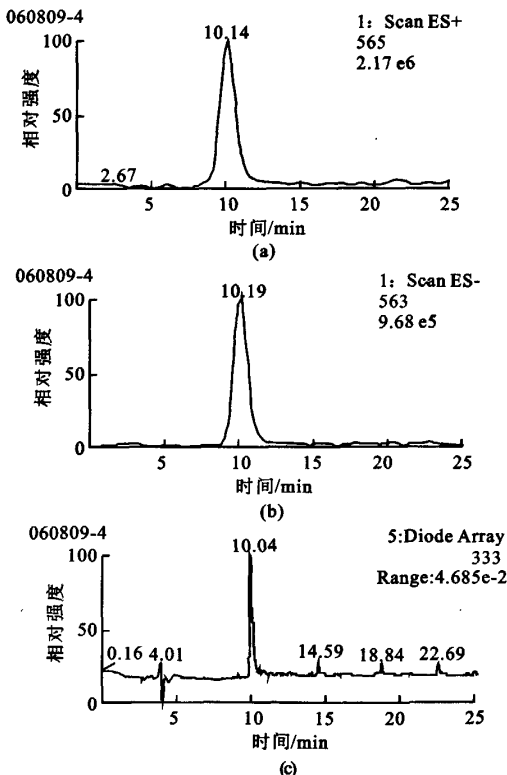


图 2 灵芝三萜皂甙的 LC/MS 图谱

Fig. 2 The LC/MS spectrum of compound saponin from *G. lucidum*

图 3 为对应正负离子色谱峰的 EMS-MS 图谱。分析图 3:在 ES+ 图谱中有 $m/z 565 [M+H]^+$,

587.1[M+Na], 602.8[M+K], 而在 ES- 图谱中有 m/z 563 [M-H]。据此可以确定化合物 GCTL1 的相对分子质量为 564。该化合物的正离子图谱(见图 3) 中除了[M+Na]、[M+K]碎片外, 还显示有 3 个主要的离子碎片, 分别为 m/z 648.5,

m/z 435.4, m/z 348.6。可以推断在电离过程中产生碎片 m/z 648.5 [M+K+Na+H₂O-H]、 m/z 435.4 [M+K-162], m/z 348.6 [M-162-H₂O], 其中 162 代表失去 1 个糖基。这说明了此种皂甙是连有 1 个糖基的皂甙。

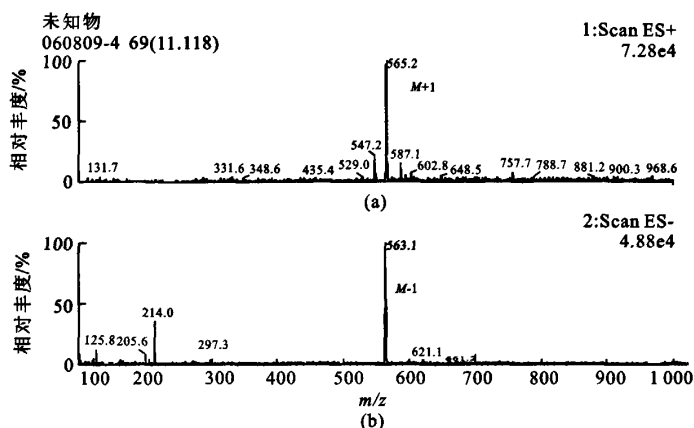


图 3 化合物 I 的 ESI-MS 图谱

Fig. 3 ESI-MS spectrum of saponin from *G. Lucidum*

相对分子质量 564 去掉一个为 162 的糖基, 甙元的相对分子质量为 402, 查阅文献^[4], 为灵芝化合物 lucidone A, 所以推测了化合物可能是 lucidone A 与六碳糖形成的皂甙。其分子式为: C₃₀H₄₄O₁₀, 可能的结构式见图 4。

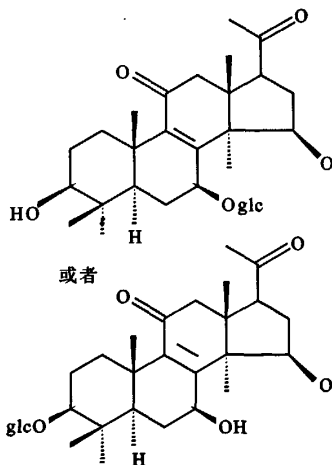


图 4 相对分子质量为 564 的灵芝三萜皂甙

Fig. 4 M_r564 triterpenoid saponin from *G. lucidum*

由图 4 可见, 甙元的母核结构为 V 型。图中的糖为六碳糖, 为了进一步推断化合物 GCTL1 的结构, 采用紫外、红外光谱来检测化学结构中的功能团, 对化合物 GCTL1 的结构做进一步研究。

2.3.2 化合物 GCTL1 的紫外光谱分析 从紫外

图谱可知化合物 GCTL1 的紫外吸收在 219.6 和 270 nm 以及 334.6 nm 处有特征吸收(见图 5)。219.6 和 334.6 nm 的吸收峰证明了结构中有 α 、 β 不饱和酮。而推测的 lucidone A 中有这样的结构。

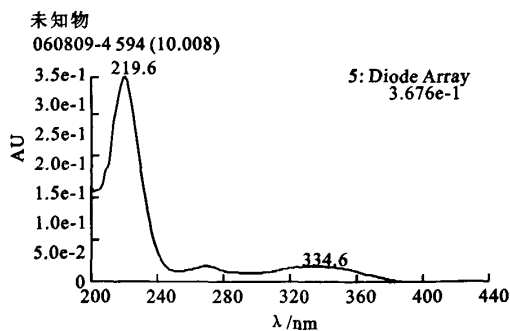


图 5 灵芝三萜皂甙的紫外图谱(甲醇)

Fig. 5 The ultraviolet absorption spectrum of saponin from *G. Lucidum*

2.3.3 化合物 GCTL1 的红外光谱分析 图 6 可得到以下信息: 在 3 405.98 cm⁻¹、1 089.75 cm⁻¹ 有强的吸收, 说明结构中有羟基; 在 2 927.71 cm⁻¹ 处的强吸收是 CH₃、CH₂ 的 C-H 伸缩振动; 在 1 713.78 cm⁻¹ 处的吸收峰是羰基的特征吸收峰; 在 1 656.60 cm⁻¹ 处的吸收峰是 α 、 β 不饱和酮特征吸收, 在 1 424.67 cm⁻¹ 处是 C-O 的特征吸收峰。这些都印证了 lucidone A 的结构。

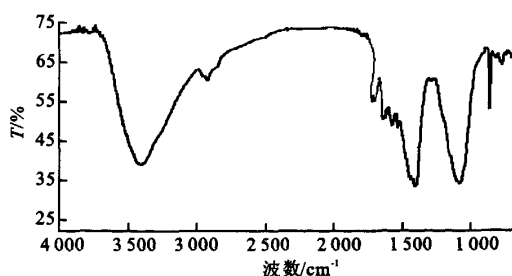


图6 灵芝三萜皂甙的红外吸收光谱

Fig. 6 The infrared absorption spectrum of saponin from *G. lucidum*

GCTL1 经过酸水解和纸层析,鉴定糖为葡萄糖,但是糖的连接位置和方式还须进一步研究。

综合质谱分析、红外和紫外图谱推测,结合文献报道,可推测 GCTL1 的结构是甙元为 lucidone A 的带有一个葡萄糖基的三萜皂甙。

3 结 语

通过大孔树脂、凝胶柱 Sephadex LH20 以及反相 ODS 色谱,成功地分离纯化到一种灵芝三萜皂甙,并经 HPLC 检测分析,纯度达到 94% 以上。这为灵芝三萜皂甙标准品的制备提供了理论依据。由此表明建立的分离纯化方法有效可行。至于此种皂甙的进一步结构鉴定和生理活性,有待进一步研究。

参考文献(References):

- [1] Carmen W H, Xin D. Chromatographic and electrophoretic methods for Lingzhi pharmacologically active components[J]. *J Chromatography B*, 2004, 812: 241-257.
- [2] 杨海龙, 灵芝发酵新型抗肿瘤制剂的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2004.
- [3] 李雁群, 章克昌. 灵芝转化苦参水提物的 3 个新成分体外抗乙型肝炎病毒作用[J]. *微生物学报*, 2005, 45(4): 643-646.
LI Yan-qun, ZHANG Ken-chang. Invitro inhibitory effects on HBsAg and HBeAg secretion of 3 new components produced by *Ganoderma lucidum* in medium contained radix sophorae flavescentis extract[J]. *Acta microbiologica sinica*, 2005, 45(4): 643-646.
- [4] 梁晓天. 常用中药基础研究[M]. 北京: 科学出版社, 2004.
- [5] 钱竹. 灵芝酸液体发酵及其分离纯化的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2006.

(责任编辑: 朱明)

Labthink 兰光包装安全与检测技术全球巡回讲座拉开帷幕

为了推动包装安全与检测技术的发展与进步, Labthink 兰光于 2008 年 3 月~11 月期间, 在全球 31 个城市举办“2008 Labthink 兰光包装安全与检测技术全球巡回讲座”, 邀请包装质量检测机构, 科研院校, 行业协会, 包装、彩印企业以及食品、药品、化妆品生产企业等, 共同探讨包装检测控制技术的应用与发展。作为中国包装检测行业的引领者, Labthink 兰光以完备的研究设施、完整的核心技术、完善的解决方案著称业界, 拥有涵盖全球检测标准最全的高分子聚合物阻隔性实验室。凭借专业严谨的创新精神、及时周到的技术服务、遍布全球的营销网络以及敬业高效的人才精英团队, Labthink 兰光已为全球 3000 多家客户提供数万套检测设备及多层次技术服务。

近年来, Labthink 兰光在软包装检测技术研究领域不断推陈出新, 许多新产品、新技术在业内引起巨大反响。本次巡回讲座期间, Labthink 兰光将就与食品、药品、化妆品直接接触的包装材料对产品货架期的影响与控制; 商品包装从深冷到高温宽泛应用环境下的阻隔性检测技术; 中国法定检验机构食品、药品包装材料试验方法与数据体系的共性与特点; 全球化的软包装产品质量检测控制解决方案等问题与参会者进行面对面的交流, 并将与参会者分享一系列代表 Labthink 兰光最新发展成果的新产品、新技术。

巡回讲座将在中国的厦门、福州、长沙、武汉、成都、重庆、温州、宁波、杭州、青岛、上海、南京、无锡、郑州、漯河、合肥、桐城、天津、北京、沈阳、大连、广州等 22 个城市以及比利时布鲁塞尔、美国芝加哥、日本东京、德国杜塞尔多夫、俄罗斯莫斯科、荷兰乌得勒支、韩国首尔、泰国曼谷、印度钦奈等地举办。