

鹿角灵芝提取三萜酸的研究

李 静, 邓毛程, 王 瑶, 陈维新

(广东轻工职业技术学院, 广州 510300)

摘 要:为了高值化利用鹿角灵芝,初步研究了乙醇浸提法提取三萜酸的工艺条件。通过单因素试验和正交试验,确定了最佳的浸提条件:液固比 30:1,温度 90 ℃,时间 120 min,乙醇浓度 70% (v/v)。在最佳条件下进行验证试验,灵芝酸 A 和灵芝酸 B 的总提取率达到 0.536%。

关键词:三萜酸;鹿角灵芝;灵芝酸 A;灵芝酸 B;乙醇浸提

中图分类号:R284.2

文献标志码:A

引 言

鹿角灵芝为担子纲多孔菌科灵芝属真菌,学名 *Ganoderma amboinense* (Lam. Fr.) Pat,因其形状似鹿角而得名^[1],主要产于我国海南、云南等地区。灵芝具有抗肿瘤、抗氧化活性和增强免疫力的功能,其应用在我国具有悠久的历史,被我国第一部药学著作《神农本草经》视为滋补强壮、扶正固本的珍品^[2]。近年来,鹿角灵芝备受重视,在化学、药理和临床等领域均有大量研究,研究表明其具有调节免疫、保肝、抗肿瘤和抗衰老等多种活性^[3,4]。

三萜类化合物是灵芝的主要活性成分之一,多数三萜类化合物由 30 个碳原子组成,是由 6 个异戊二烯结构单元联结而成的化合物^[5]。三萜类化合物结构类型丰富,以四环三萜和五环三萜为主,极少数是无环三萜、二环三萜及三环三萜^[6]。近年来,药理研究表明其具有护肝排毒、抗氧化、抗菌降糖、抗 HIV 病毒和疱疹病毒、抑制肿瘤细胞等作用^[6-8]。20 世纪 80 年代至今,许多研究者已对灵芝的多糖物质和三萜类物质的提取纯化工艺进行了大量研究^[1,2,9-11]。但是,极少见有鹿角灵芝三

萜酸提取的报道。因此,本文采用乙醇浸提法对鹿角灵芝的三萜酸提取进行了初步研究,可为鹿角灵芝的开发利用提供有价值的参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

鹿角灵芝:成熟、新鲜的农产品,购自海南省;灵芝酸 A、灵芝酸 B:分析纯,购自上海融禾医药科技发展有限公司;无水乙醇等:均为分析纯,市售。

1.2 三萜类化合物的浸提方法

浸提流程:原料→干燥→粉碎→过筛→乙醇回流浸提→离心分离→浸提液。具体操作是:首先,将鹿角灵芝原料置于 100 ℃ 下干燥至恒重,再经粉碎、100 目筛分离,获取 100 目以下的粉末;然后,将鹿角灵芝粉末与乙醇溶液混合,置于平底烧瓶中进行恒温回流浸提,再采用离心机于 8000 r/min 进行离心分离,可获取三萜类化合物的浸提液,备用。

1.3 乙醇浓度对提取率的影响

分别采用不同浓度的乙醇溶液作为浸提溶剂,按 30:1 的液固比与鹿角灵芝粉末混合,于 100 ℃ 下回流浸

提 120 min, 优选乙醇溶液的浓度。

1.4 温度对提取率的影响

以 70% (v/v) 的乙醇溶液为浸提溶剂, 按 30:1 的液固比与鹿角灵芝粉末混合, 置于不同温度下进行回流浸提 120 min, 优选浸提的温度。

1.5 液固比对提取率的影响

以 70% (v/v) 的乙醇溶液为浸提溶剂, 按不同液固比与鹿角灵芝粉末混合, 于 100 °C 下进行回流浸提 120 min, 优选浸提的液固比。

1.6 时间对提取率的影响

以 70% (v/v) 的乙醇溶液为浸提溶剂, 按 30:1 的液固比与鹿角灵芝粉末混合, 于 100 °C 下进行回流浸提, 采用不同浸提时间进行试验, 优选浸提的时间。

1.7 正交试验

在单因素试验基础上, 再对乙醇浓度、温度、液固比、时间进行四因素三水平正交试验。

1.8 三萜酸测定与提取率计算

灵芝酸 A 和灵芝酸 B 是 Kutoba 等 1982 年首次从灵芝中分离得到的三萜类物质^[12], 也是灵芝中含量较高的三萜类成分, 故选择灵芝酸 A 和灵芝酸 B 为鹿角灵芝三萜酸提取物的检测成分。参考文献[13]的 HPLC 检测方法, 以灵芝酸 A 和灵芝酸 B 的甲醇溶液为对照品, 采用岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪进行检测。样品预处理: 采用旋转真空蒸发器将提取液样品蒸发至干, 用甲醇溶解残渣, 配制成溶液, 经 0.22 μm 滤膜过滤。色谱条件: 色谱柱为 Inertsil ODS-SP (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 检测灵芝酸 A 的流动相为乙腈-0.01% 磷酸水溶液(乙腈:0.01% 磷酸水溶液 = 35:65); 检测灵芝酸 B 的流动相为乙腈-0.1% 磷酸水溶液(乙腈:0.1% 磷酸水溶液 = 30:70); 流速为 1.0 mL/min; 检测波长为 255 nm; 柱温为 22 °C; 进样体积为 10 μL。

以灵芝酸 A 和灵芝酸 B 的含量总和计算鹿角灵芝三萜酸的提取率, 计算式为:

提取率 =

$$\frac{(\text{灵芝酸 A 含量} + \text{灵芝酸 B 含量}) \times \text{浸提液的体积}}{\text{原料质量}}$$

2 结果与分析

2.1 乙醇浓度对提取率的影响

在不同乙醇浓度的条件下, 三萜酸的提取率如图 1

所示。从图 1 可以看出, 60% ~ 80% 的乙醇溶液有利于灵芝酸 A 和灵芝酸 B 的浸提, 在此范围内的提取率较高, 其中乙醇浓度为 70% 时的提取率达到最高。

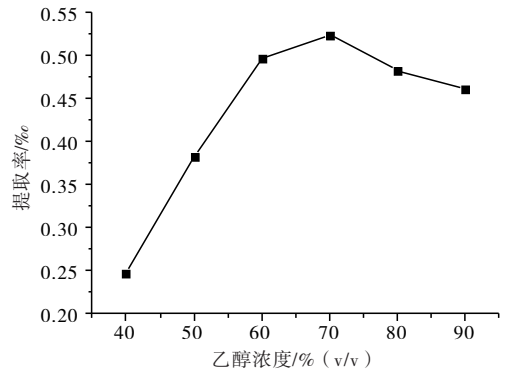


图 1 不同乙醇浓度下的提取率

2.2 温度对提取率的影响

在不同温度下, 三萜酸的提取率如图 2 所示。升高浸提温度, 可使物料处于沸腾状态, 有利于原料与溶剂的充分接触; 同时, 可促进分子运动, 有利于溶质与溶剂的相互渗透。从图 2 可以看出, 在较低温度范围内, 提取率随温度升高而增大; 在 85-95 °C 的温度范围内, 三萜酸的提取率较高, 其中温度为 90 °C 时的提取率最高; 当温度超过 90 °C 时, 提取率反而略有下降, 可能因温度过高使某些成分损失。

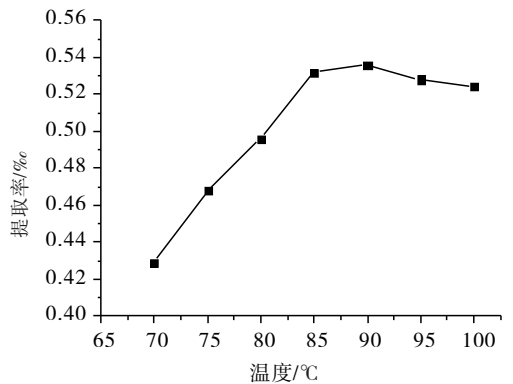


图 2 不同温度下的提取率

2.3 液固比对提取率的影响

在不同液固比下, 三萜酸的提取率如图 3 所示。增大液固比的增大, 可使原料浓度降低, 有利于原料中目标成分充分的浸提。从图 3 可以看出, 随着液固比的增大, 三萜酸的提取率呈上升趋势; 液固比达到 30:1 时, 继续增大液固比, 提取率变化十分平缓。从节约溶剂考虑, 最适宜的液固比可选取 30:1。

2.4 时间对提取率的影响

在不同时间下, 三萜酸的提取率如图 4 所示。由于

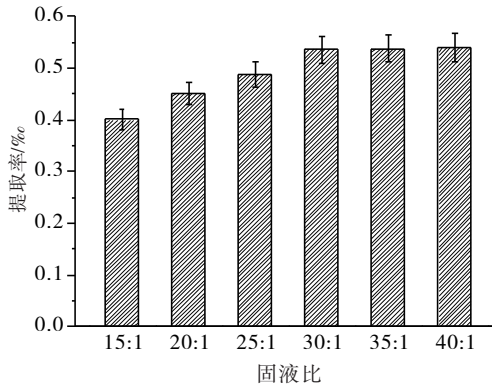


图3 不同液固比下的提取率

分子扩散、溶解需要一定时间,为了使灵芝酸 A 和灵芝酸 B 被充分浸提出来,应保证足够的浸提时间;但是,如果浸提的时间过长,可能会导致某些成分受热损失。结果表明,浸提的时间为 120 min 时,三萜酸的提取率达到最高。

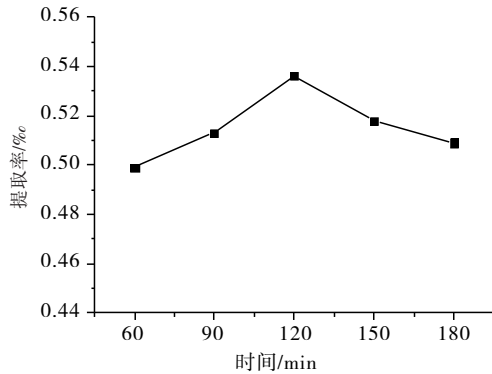


图4 不同时间下的提取率

2.5 正交试验结果

根据单因素试验结果,正交试验设计见表1。在单因素试验基础上,选择合理的因素水平进行正交试验,正交试验结果见表2,方差分析结果见表3。由表2 直观分析可知,极差最大的是 C 因素,对三萜酸提取率的影响排序是:C > B > D > A。方差分析结果表明,对于三萜酸的提取率,因素 C 具有非常显著性的影响,因素 B 具有显著性的影响,因素 D 具有不显著的影响。最终确定对三萜酸浸提的最佳条件是 C₂B₂D₃A₂,即:液固比为 30:1,温度为 90 ℃,时间为 120 min,乙醇浓度为 70% (v/v)。在最佳条件下进行验证试验,三萜酸的提取率为 0.536%。

表1 因素与水平

因素	A	B	C	D
	乙醇浓度/%	温度/℃	液固比	时间/min
水平1	60	85	20:1	90
水平2	70	90	25:1	120
水平3	80	95	30:1	150

3 结束语

乙醇浓度、温度、液固比和时间对鹿角灵芝三萜酸的提取率均有影响。通过单因素试验和正交试验,确定最佳的浸提条件为:液固比 30:1,温度 90 ℃,时间 120 min,乙醇浓度 70% (v/v)。在最佳条件下进行验证试验,灵芝酸 A 和灵芝酸 B 的总提取率达到 0.536%。本文对于鹿角灵芝三萜酸的提取工艺条件的进一步研具有一定的参考价值。

表2 正交试验结果

编号	A	B	C	D	三萜酸的总提取率/%
1	1	1	1	1	0.413
2	1	2	2	2	0.480
3	1	3	3	3	0.504
4	2	1	2	3	0.461
5	2	2	3	1	0.520
6	2	3	1	2	0.432
7	3	1	3	2	0.526
8	3	2	1	3	0.457
9	3	3	2	1	0.428
K ₁ /3	0.46	0.46	0.43	0.45	
K ₂ /3	6	7	4	4	
K ₃ /3	0.47	0.48	0.45	0.47	

表3 方差分析结果

方差来源	偏差平方和	自由度	均方	F 值	F 临界值	显著性
A	0.00005	2	0.00003			
B	0.00147	2	0.00074	24.67	19.00	显著
C	0.01097	2	0.00549	183.0	99.00	非常显著
D	0.00110	2	0.00055	18.33	19.00	不显著

参考文献:

- [1] 覃海元,潘嫣丽,覃梅珍.热水与超声波提取鹿角灵芝多糖工艺比较研究[J].中国食品添加剂,2011(3): 91-95.
- [2] 胡斌杰,陈金锋,王官南.超声波法与传统热水法提取灵芝多糖的比较研究[J].食品工业科技,2007(2): 190-192.
- [3] 刘研新,余彦,王蓓,等.鹿角灵芝胶囊的抗肿瘤活性及对顺铂所致肾损伤的保护作用[J].华西药理学杂志,2008,23(5):564-566.
- [4] 贺玉琢.鹿角灵芝的抗癌作用及放射线防护作用[J].国外医学:中医中药分册,2005,27(4):245-255.
- [5] 蒙丽丽,黄初升,刘红星.具有生物活性的天然三萜化合物的研究进展[J].广西植物,2008,28(6):856-860.

- [6] 孙常松,李玛琳.五环三萜类化合物抗肿瘤活性及其机制研究进展[J].中国民族民间医药,2009,12:14-16.
- [7] 张园,张信文,陈光英.五环三萜类化合物抗肿瘤作用的研究进展[J].海南师范大学学报:自然科学版,2011,24(1):92-95.
- [8] 宋长城,朱美玲.中药所含三萜类化合物抗肿瘤活性及其作用机制的研究进展[J].现代肿瘤医学,2011,19(9):1180-1183.
- [9] 袁媛,杨毅,开桂青,等.灵芝三萜提取工艺研究[J].安徽化工,2007,33(4):27-29.
- [10] 吴建国,王敏慧,吴岩斌,等.硬孔灵芝三萜酸提取工艺研究[J].福建中医药大学学报,2011,21(5):32-34.
- [11] 刘晶晶,章晋武,徐培娟.超临界 CO₂ 萃取灵芝孢子油中三萜类化合物[J].食品研究与开发,2009,30(9):56-58.
- [12] Kubota T,Asaka Y,Miura I,et al.Structures of ganoderic acid A and B,two new lanostane type bitter triterpenes from *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst[J].Helvetica Chimica Acta,1982,65(2):611-619.
- [13] 卢端萍,陈硕,王勇,等.HPLC 测定赤芝水提取物中灵芝酸 A 含量[J].中国现代中药,2013,15(6):496-499.

Study on the Extractive Technique of Triterpenic Acid From *Ganoderma Amboinense*

LI Jing, DENG Maocheng, WANG Yao, CHEN Weixin

(Guangdong Industry Technical College, Guangzhou 510300, China)

Abstract: In order to achieve the high-valued utilization of *Ganoderma amboinense*, the preliminary study about conditions of extractive technique of triterpenic acid by ethanol reflux is developed. Using the single factor experiment and orthogonal design experiment respectively, the optimum conditions are determined as follows: liquid-solid ratio of 30, extracting temperature of 90 °C, extracting time of 120min and ethanol concentration of 70% (v/v). Under the optimum conditions, the total extraction rate of Ganoderic acid A and Ganoderic acid B can reach 0.536%.

Key words: triterpenic acid; *Ganoderma amboinense*; Ganoderic acid A; Ganoderic acid B; ethanol reflux