

灵芝(赤芝孢子粉)化学成分的研究再报

侯翠英

(中国医学科学院药用植物资源开发研究所, 北京)

孙义廷

(中国人民解放军空军北京医院)

杨琳 薛红

(中国医学科学院药物研究所, 北京)

摘 要

从赤芝孢子粉的水溶部分分得 2 种含氮化合物, 从脂溶部分得到 8 种单体和 2 种纯度较差的成分。根据物化性质、光谱分析等方法, 两种水溶性成分分别鉴定为胆碱和甜菜碱, 8 种脂溶成分鉴定为廿四烷酸、硬脂酸、棕榈酸、麦角甾-7, 22-二烯-3 β -醇、廿二烷酸、十九烷酸、廿四烷、卅一烷。另外 2 种成分分别鉴定为麦角甾醇和 β -谷甾醇, 但两者纯度较差, 均混有少量的麦角甾 7, 22-二烯-3 β -醇。

关键词 赤芝; 孢子粉; 胆碱; 甜菜碱; 麦角甾-7, 22-二烯-3 β -醇; 长链脂肪酸, 长链烷烃

赤芝孢子粉是灵芝属真菌 [*Ganoderma lucidum* (Leyss. et Fr.) Karst] 散放出来的孢子体, 用它制成的针剂《肌生注射液》, 经临床试用于多种疑难疾病, 如萎缩性肌强直、多发性硬化、内脏多动症等均有较满意的疗效^[1,2,3]。曾报道从赤芝孢子粉中分离出 α, α -海藻糖等成分^[4]。为了进一步阐明其有效成分, 我们继续对赤芝孢子粉的化学成分进行了研究。

原料用乙醇和水相继提取、提取物经乙醚脱脂, 水溶部分采用雷氏盐沉淀法, 得到含氮水溶物, 经氧化铝柱层析和制备薄层析, 分得 I 和 II 两种单体, 根据物化性质、薄层同层析以及红外光谱对照, 证明 I 为胆碱, II 为甜菜碱。

孢子粉乙醚提取物, 通过硅胶柱层析和高压液相层析等方法, 分得 4 个单体 III—VI 和 2 个由 2 种成分组成的混合结晶 VII—VIII、化合物 III—VI 经质谱、红外和薄层层析等方法, 分别鉴定为廿四烷酸、硬脂酸、棕榈酸和麦角甾-7, 22-二烯-3 β -醇。

VII 为无色针晶、熔点 176—182°C, 对 Liebermann 试验呈阳性反应, 红外光谱示有羟基 (3.01 μ)。质谱给出主要分子离子峰 m/z 414, 并可看到 β -谷甾醇的一系列碎片峰。此外还能看到由少量 m/z 398 的麦角甾-7, 22-二烯-3 β -醇裂解生成的一系列碎片峰, 因此证明 VII 为 β -谷甾醇、同时杂有少量麦角甾-7, 22-二烯-3 β -醇的混合物。

VIII 为无色针晶,熔点 166—170°C,对 Liebermann 呈阳性反应,红外光谱示有羟基和共轭双键 (6.12μ)、质谱主要给出 m/z 396 的分子离子峰,可看到由麦角甾醇裂解生成的一系列碎片峰,另外还能辨认出少量的由麦角甾-7,22-二烯-3 β -醇裂解生成的碎片峰,故证明 VIII 为麦角甾醇但杂有少量麦角甾-7,22-二烯-3 β -醇的混合物。

孢子粉乙醇提取物经乙醚提取得到的脂溶部分,通过氧化铝柱层析,分得 IX—XII 4 个单体,根据物化性质、质谱、红外和薄层层析等方法,分别鉴定为十九,廿二烷酸,以及廿四和卅一烷。

本文首次报道自赤芝的孢子粉中分得胆碱和甜菜碱这两种成分都具有生理活性、甜菜碱临床上将其和 N-脒基甘氨酸 (glycocyanine) 共用以治疗肌无力^[3]。故可能是《肌生注射液》的有效成分之一。

实 验 部 分

熔点用 Kofler 显微镜熔点测定器测定,未校正;紫外光谱用 ORD/UV5 测定,红外光谱用 Perkin-Elmer 21 型仪测定 KBr 压片;质谱用 JMS-OZSB 测定;核磁用 FX-90Q 型仪测定;薄层层析及柱层析用的硅胶是青岛海洋化工厂产品。柱层用中性氧化铝是上海五四农场化学试剂厂生产,薄层析用氧化铝为 Merck 厂生产。

水溶成分 I 和 II 的提取

6.5kg 孢子粉用 95%、60% 乙醇相继提取后再用水提取、分别浓缩提取液,合并后乙醚脱脂。水溶液用盐酸调至 pH2,制成雷氏盐常法处理,得到黄棕色固体物 3.79g。

水溶性物质 I 的分离和鉴定

将 3.79g 黄棕色物在 330g III 级氧化铝柱上进行层析,以氯仿,甲醇洗脱,每份收集 200ml,洗脱液 9—12 份 (10% 甲醇/氯仿洗脱)。浓缩后得白色针晶 I,但在空气中极易吸潮,变成无色糖浆状物,不易结晶。氧化铝薄层析以氯仿-甲醇 (2.5:1) 展开,碘化铋钾显色,显单一斑点, Rf 值 0.70,与标准品胆碱一致。红外叠谱与标准品胆碱完全相符,故证明 I 为胆碱。

水溶物 II 的分离和鉴定

洗脱液 69—106 份 (甲醇洗脱),薄层析显两个斑点,采用氧化铝制备薄层分离,氯仿-甲醇 (2.5:1) 展开收集 Rf 值 0.30 部分,甲醇洗脱,得淡黄色棱柱状结晶 II,甲醇重结晶得白色棱柱状结晶,具吸湿性,加热至 315°C 分解 (文献报道 310°C 左右分解^[3])。氧化铝薄层层析,氯仿-甲醇 (2.5:1) 展开,碘化铋钾显色,呈桔红色单一斑点, Rf 值 0.37,与标准品甜菜碱一致。红外光谱与标准品甜菜碱相同,故证明物质 II 即甜菜碱。

孢子粉脂溶性成分的提取

将孢子粉装入改良沙氏提取器中,乙醚迴流 7 小时,回收乙醚得黄棕色脂溶部分。

脂溶性成分的分离和鉴定

将 30g 乙醚提取物溶于少量乙醚,用 45g 硅胶搅匀,挥去溶剂进行柱层析 (柱高 150cm,内径 6cm),己烷装柱,以己烷,醋酸乙酯和甲醇为洗脱剂,每份收集 200ml。

结晶 III 的分离和鉴定

洗脱液 21—22 份 (5% 醋酸乙酯/己烷洗脱),自己烷重结晶得白色固体物,熔点

60°C, 薄层析显单一斑点。氯仿: 甲醇 (9:1) 展开, Rf 值 0.73; 己烷: 醋酸乙酯 (7:3) 展开, Rf 值为 0.65。红外光谱显示长链脂肪酸, 质谱: m/z 368(M^+), 354, 340, 326, 312, 298, 284, 256, 242, 241, 227, 213, 199, 185, 171, 157, 143, 129, 115, 97, 83, 73, 60, 57, 43, 29, 18, 证明为廿四碳烷酸。

结晶 IV 的分离和鉴定

洗脱液 37—39 份 (5% 醋酸乙酯/己烷洗脱) 自丙酮重结晶得白色结晶, 薄层层析显单一斑点, Rf 值与标准品硬脂酸相同。熔点 55—56°C, 质谱给出分子离子峰 m/z 284 (M^+)。红外光谱与标准品硬脂酸一致, 故证明为硬脂酸。

结晶 V 的分离和鉴定

洗脱液 43—48 份经己烷处理得白色粒状物, 熔点 59—60°C。硅胶 G 薄层析显单一斑点, Rf 值与标准品棕榈酸一致。红外和质谱均与标准品棕榈酸的相同, 因此证明结晶 V 为棕榈酸。

结晶 VI 的分离和鉴定

洗脱液 90—92 份 (50% 醋酸乙酯/己烷洗脱), 经石油醚多次处理得白色结晶, 丙酮重结晶得白色针晶, 熔点 156—158°C。硅胶 G 薄层层析显单一斑点, 己烷: 醋酸乙酯 (2:1) 展开, Rf 值 0.66, 对 Liebermann 呈蓝绿色反应, 红外光谱示有羟基 (3.01μ), 核磁共振氢谱呈现甾体化合物多甲基峰的显著特征, δ (ppm) ($CDCl_3$), 0.52 (3H, 单峰, C_{18} -甲基), 0.78 (3H, 单峰, C_{19} -甲基), 1.00 (3H, 双峰, C_{21} -甲基), 0.89 (3H, 双峰, C_{28} -甲基), 0.81 (3H, 双峰, C_{26} -甲基), 0.81 (3H, 双峰, C_{27} -甲基), 3.58 (1H, 多重峰, C_3 -H), 5.15—5.23 (3H, 多重峰, 烯烃质子)。质谱: m/z 398 (M^+) 以及一系列碎片峰 383 ($M^+ - CH_3$), 355 [$M^+ - CH(Me)_2$], 273 ($M^+ - C_9H_{17}$), 271 (273 - 2H), 255 (273 - H_2O), 231 (273 - D 环), 229 (271 - D 环 - 2H), 213 (231 - H_2O)。根据上述数据。证明该化合物为麦角甾-7, 22-二烯-3 β -醇。

结晶 VII (混合物) 的分离和鉴定

洗脱液 93—101 份经高压液相层析 [色谱柱: 固定相硅胶 H, 流动相: 己烷/醋酸乙酯 (70%, 60%, 50%), 压力: 2—4 kg/cm², 流速: 32 ml/min, UV 检测器 254, 量程: 32], 收集 201 份。

高压液层第 21—22 份为针晶, 经石油醚多次处理得白色针晶, 熔点 176—182°C, 硅胶 G 薄层析, 己烷: 醋酸乙酯 (7:3) 展开, Rf 值 0.42 (磷钼酸试剂显色)。红外光谱示有羟基 (3.05μ), 对 Liebermann 呈蓝绿色。质谱 m/z 414 (M^+) 为主要峰, 可以看到一系列碎片峰, m/z 414 (M^+ , β -谷甾醇), 385 ($M^+ - Et$), 381 ($M^+ - CH_3 - H_2O$), 273 ($M^+ - C_{10}H_{21}$), 255 (273 - H_2O), 231 (273 - D 环), 213 (231 - H_2O), 159; 此外还可见与 m/z 414 没有关系的 m/z 398 峰, 结合其它碎片峰后, 可以看到存在 M^+ 为 m/z 398 的麦角甾 7, 22-二烯-3 β -醇。因此证明结晶 VII 是混合物。

结晶 VIII (混合物) 的分离和鉴定

高压液层第 23—25 份, 为白色针晶, 经石油醚处理, 再经氯仿重结晶, 得白色针晶, 熔点 166—170°C, 硅胶 G 薄层析, 氯仿: 甲醇 (9:1) 展开, Rf 值 0.75, 对 Liebermann 呈阳性反应。红外光谱示有羟基 (3.05μ) 和共轭双键 (6.10μ)。质谱 m/z 396 (M^+) 为主

要峰,可以看到一系列碎片峰。 m/z 396(M^+ , 麦角甾醇), 381($M^+ - CH_3$), 378($M^+ - H_2O$), 363($M^+ - CH_3 - H_2O$), 337, 271($M^+ - C_9H_{17}$), 269, 253(271 - H_2O), 211, 199, 197, 157, 143; 此外还能见到与 m/z 396 没有关系的 m/z 398, 结合其它碎片峰, 可以看到存在 M^+ 为 m/z 398 的麦角甾 7, 22-二烯-3 β -醇。故证明结晶 VIII 亦是混合物。

结晶 IX 的分离和鉴定

孢子粉 1kg 95% 乙醇提取物,经乙醚处理得 2.36g 米黄色蜡状物,该物进行氧化铝柱层析(柱高 10cm, 内径 4cm), 苯-甲醇洗脱, 每份 100ml。洗脱液 44—65 份(5% 甲醇/苯洗脱), 回收溶剂得黄白色固体物,经甲醇多次处理得黄白色球晶,熔点 42—48 $^{\circ}C$, 红外光谱显示长链脂肪酸, 质谱给出分子离子峰 m/z 298(M^+), 其它裂片峰为递减 14 的有规则峰。证明该物为十九烷酸。

结晶 X 的分离和鉴定

洗脱液 121—128 份(甲醇洗脱)、乙醇加热处理后,放置析出白色结晶, 甲醇重结晶, 熔点 72—78 $^{\circ}C$, 硅胶 G 薄层析, 苯: 甲醇(10:1) 展开, R_f 值 0.66。质谱 m/z 340(M^+)。红外和质谱均显示长链脂肪酸的特征。故证明该结晶为廿二烷酸。

30g 乙醚提取物经 5% $NaHCO_3$, 及 5% $NaOH$ 溶液处理后得中性部分 13.31g 油状物,此物进行氧化铝柱层析(柱高 108cm, 内径 4.3cm), 氧化铝 800g, 洗脱剂从石油醚开始逐渐增加极性溶剂(醋酸乙酯, 甲醇), 每份 200ml。

结晶 XI 的分离和鉴定

洗脱液 5—13 份(石油醚洗脱)油状物,室温放置析出黄白色结晶,醋酸乙酯多次处理得白色结晶。熔点 50—58 $^{\circ}C$, 红外光谱(μ): 3.50, 3.55, 4.34, 6.82, 7.23, 13.65, 13.82。质谱: m/z 338(M^+), 323, 309, 295, 281, 267, 253, 239, 225, 211, 197, 183, 169, 155, 141, 127, 113, 99, 85, 71, 57, 43, 29, 18, 证明该结晶为廿四烷。

结晶 XII 的分离和鉴定

洗脱液 40—44 份(3% 醋酸乙酯/石油醚洗脱), 浓缩后得白色粒状结晶, 醋酸乙酯重结晶得白色无定形片晶, 熔点 104—108 $^{\circ}C$, 薄层层析, 石油醚: 醋酸乙酯(10:0.5) 展开, R_f 值 0.59。质谱给出分子离子峰 m/z 436(M^+), 显示长链烷烃类。红外光谱亦示长链烷烃类, 故证明为卅一烷。

参 考 文 献

- [1] 王芷沅、张振英, 1983: 赤芝孢子粉制剂治疗内脏多动症 2 例报告。中医杂志, 24(6): 52。
- [2] 北京友谊医院神经科, 1978: 应用灵芝制剂治疗多发性硬化 5 例。新医学副刊, 神经系统疾病, 4(2): 97。
- [3] 林启寿, 1977: 中草药成分化学(第一版)。科学出版社, 北京, 第 37 页。
- [4] 侯翠英, 1979: 灵芝(赤芝孢子粉)化学成分的研究。中草药通讯, 10(6): 4—5。
- [5] 富慧谔、王芷沅, 1981: 应用赤芝孢子粉制剂治疗 10 例萎缩性肌强直的临床观察。中医杂志, 22(6): 22—23。

**STUDIES ON THE CHEMICAL CONSTITUENTS OF THE
SPORES FROM *GANODERMA LUCIDUM*
(Leyss. et Fr.) KARST**

Hou Cui-ying

(*Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing*)

Sun Yi-ting

(*Beijing Air Force Hospital of The Chinese People's Liberation Army*)

Yang Lin and Xue Hong

(*Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing*)

Abstract

Two and ten compounds were isolated from the water portion and the ethereal soluble lipophilic fraction of *Ganoderma lucidum* respectively. On the basis of their chemical properties and co-TLC and IR spectral analysis, the two compounds from the water portion were identified as choline (I) and betains (II), ten compounds from the ethereal soluble fraction as tetracosanoic acid, stearic acid, palmitic acid, ergosta-7, 22-diene-3 β -ol, nonadecanoic acid, benenic acid, tetracosane, hentriacontane, ergosterol and β -sitosterol. In addition, there are two compounds not be purified as contaminated by a small amount of ergosta-7, 22-diene-3 β -ol.